

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y
TECNOLOGÍA

Caracterización Molecular de cepas de *Escherichia coli*
aisladas de muestras fecales y de aguas mediante ERIC-PCR
y análisis del perfil plasmídico

Flor Marina Núñez Bósquez

Tesis presentada como uno
de los requisitos para optar
al grado de Maestría en
Microbiología Ambiental

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2017

57



Título de la Tesis:

03 APR 2018
"Caracterización Molecular de Cepas de *Escherichia coli* aisladas de muestras fecales y de aguas mediante ERIC-PCR y análisis del perfil plasmídico"

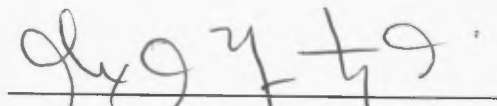
TESIS

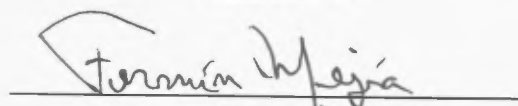
Sometida para optar al título de Maestría en Microbiología Ambiental

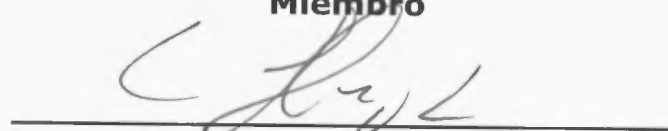
Vicerrectoría de Investigación y Postgrado

Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología

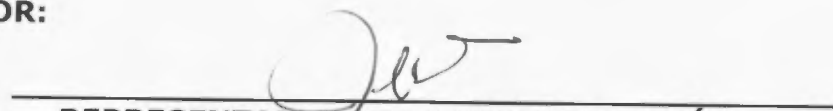
APROBADO POR:


Doctor Alex Martínez
Presidente


Mgter. Fermín Mejía
Miembro


Mgter. Humberto Cornejo
Miembro

Obsequio del autor
REFRENDADO POR:


REPRESENTANTE DE LA VICERRECTORÍA
DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

FECHA:

14 NOVIEMBRE DE 2017

Dr ALEX O MARTINEZ TORRES Profesor Especial del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Panama

CERTIFICA QUE FLOR MARINA NUÑEZ BÓSQUEZ

Ha realizado bajo su direccion el trabajo de investigacion correspondiente a su Tesis de Maestria con el titulo CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DE MUESTRAS FECALES Y DE AGUAS MEDIANTE ERIC PCR Y ANALISIS DEL PERFIL PLASMIDICO

Revisado este trabajo autoriza su presentacion para ser juzgado y para que asi conste a los efectos oportunos firma el presente certificado en Panama el ____ de _____ de 2017

Dr ALEX O MARTINEZ TORRES

AGRADECIMIENTO

Esta oportunidad es para darle gracias a Dios y a toda mi familia por ayudarme a culminar el reto personal y profesional de estudiar esta Maestria en Microbiologia Ambiental

Quiero expresar mi gratitud y aprecio a todas aquellas personas que de una u otra manera me ayudaron en el desarrollo de este trabajo de investigacion

Extiendo mi profundo agradecimiento a mi asesor de tesis Profesor Dr Alex O Martinez Torres por su invaluable e imprescindible guia supervision y paciencia y sobre todo por brindarme su constante apoyo moral a lo largo de este trabajo

Tambien le agradezco al Mgter Fermin Mejia por su apoyo y orientacion durante la investigacion a la Dra Nidia Sandoval por permitirme la utilizacion de ciertos equipos en el Laboratorio de Investigaciones en Parasitologia Ambiental a la Licda Liuris Herrera por apoyarme en la obtencion de ciertos insumos de laboratorio y muy especialmente a la Mgter Marisela Castillo por apoyarme en la parte estadistica del trabajo

Igualmente estoy agradecida por el apoyo moral del Mgter Humberto Cornejo de todos mis amigos y compañeros que me brindaron sus palabras de aliento en momentos dificiles de mi vida

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres Teresa y Manuel a mi hijo Lucas Adrian Cordoba
y a la memoria de su padre Luis Alberto Cordoba

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE FIGURAS	XI
INDICE DE CUADROS	XII
ABREVIATURAS	XIII
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCION	4
1 REVISION DE LITERATURA	9
1 1 Taxonomia y características microbiológicas de <i>E coli</i>	10
1 2 Filogenia	14
1 3 <i>E coli</i> en el tracto intestinal	17
1 4 <i>E coli</i> en el ambiental	19
1 5 <i>E coli</i> como indicador de contaminación fecal	24
1 6 Patotipos de <i>E coli</i>	27
1 6 1 <i>E coli</i> enterotoxigenica	29
1 6 2 <i>E coli</i> enteropatogenica	30
1 6 3 <i>E coli</i> enterohemorrágica	31
1 6 4 <i>E coli</i> enteroinvasiva	33
1 6 5 <i>E coli</i> enteroagregativa	34
1 6 6 <i>E coli</i> de adherencia difusa	35
1 6 7 <i>E coli</i> de adherencia invasiva	36
1 7 Genoma	40
1 7 1 Plásmidos	42
1 8 Métodos de genotificación microbiano	44
1 8 1 Métodos basados en la restricción del ADN	44

1 8 2 Metodos basados en la amplificacion de acidos nucleicos	47
1 8 3 Metodos basados en la secuenciacion de ADN	49
1 9 Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensos (ERIC-PCR)	49
2 OBJETIVOS	51
3 MATERIALES Y METODOS	53
3 1 Aislamientos bacterianos de <i>E coli</i>	54
3 2 Extraccion de ADN cromosomico con el Kit Wizard Genomic DNA Purification	54
3 3 Extraccion de ADN cromosomico por el metodo de lisis alcalina	55
3 4 Extraccion de ADN plasmidico por el metodo de lisis alcalina	56
3 5 Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensos (ERIC PCR)	57
4 RESULTADOS	59
4 1 Determinacion de la presencia de plasmidos en cepas de <i>E coli</i>	60
4 2 Caracterizacion de la diversidad genetica de cepas de <i>E coli</i> por la Tecnica de ERIC-PCR	63
5 DISCUSION	108
5 1 Determinacion de la presencia de plasmidos en cepas de <i>E coli</i>	109
5 2 Caracterizacion de la diversidad genetica de cepas de <i>E coli</i>	112
6 CONCLUSIONES	116
7 RECOMENDACIONES	118
8 BIBLIOGRAFIA	120

INDICE DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1	Micrografias electronicas de barrido de <i>E coli</i> 11
Figura 2	Fotomicrografias electronicas de <i>E blattae</i> <i>E coli</i> <i>E fergusonii</i> <i>E hermannii</i> y <i>E vulneris</i> 13
Figura 3	Relacion aproximada entre cepas de <i>E coli</i> y <i>Shigella</i> de un analisis de agrupamiento de distancias 15
Figura 4	Diagrama del ciclo de vida de <i>E coli</i> 23
Figura 5	Esquemas de la patogenicidad de los patotipos intestinales de <i>E coli</i> 38
Figura 6	Secuencia ERIC 50
Figura 7	Prevalencia de plasmidos en cada una de las comunidades muestreadas 62
Figura 8	Prevalencia de plasmidos en las diferentes fuentes de muestreo y comunidades 62
Figura 9	Electroforesis en gel de agarosa del ERIC PCR mostrando bandas de ADN de cepas de <i>E coli</i> 64
Figura 10	Electroforesis en gel de agarosa del ERIC PCR mostrando bandas de ADN de cepas de <i>E coli</i> 65
Figura 11	Electroforesis en gel de agarosa del ERIC PCR mostrando bandas de ADN de cepas de <i>E coli</i> 65
Figura 12	Electroforesis en gel de agarosa del ERIC PCR mostrando bandas de ADN de cepas de <i>E coli</i> 66
Figura 13	Electroforesis en gel de agarosa del ERIC PCR mostrando bandas de ADN de cepas de <i>E coli</i> 66
Figura 14	Dendrograma de cepas de Ciudad del Nino 70
Figura 15	Dendrograma de cepas de Escobal 73
Figura 16	Dendrograma de cepas de El Arado 76
Figura 17	Dendrograma de cepas del grupo Cerdo 79
Figura 18	Dendrograma de cepas del grupo Gallina 84
Figura 19	Dendrograma de cepas del grupo Humano 89
Figura 20	Dendrograma de cepas del grupo Vaca 94
Figura 21	Dendrograma de cepas del grupo Agua 99
Figura 22	Dendrograma completo todas las cepas 105

INDICE DE CUADROS

	Pagina
Cuadro 1 Características de <i>E coli</i> en la microbiota	18
Cuadro 2 Características de los grupos de <i>E coli</i> causantes de diarrea	39
Cuadro 3 Numero de muestras positivas por plasmidos en la comunidad de El Arado de acuerdo a la fuente de muestreo	60
Cuadro 4 Numero de muestras positivas por plasmidos en la comunidad de Ciudad del Niño de acuerdo a la fuente de muestreo	61
Cuadro 5 Numero de muestras positivas por plasmidos en la comunidad de Escobal de acuerdo a la fuente de muestreo	61
Cuadro 6 Cepas de <i>E coli</i> utilizadas en el ERIC-PCR	63
Cuadro 7 Historial de Conglomeracion de datos de La Ciudad del Niño	69
Cuadro 8 Historial de Conglomeracion de datos de Escobal	72
Cuadro 9 Historial de Conglomeracion de datos de El Arado	75
Cuadro 10 Historial de Conglomeracion de datos del Grupo Cerdo	78
Cuadro 11 Historial de Conglomeracion de datos del Grupo Gallina	83
Cuadro 12 Historial de Conglomeracion de datos del Grupo Humano	88
Cuadro 13 Historial de Conglomeracion de datos del Grupo Vaca	93
Cuadro 14 Historial de Conglomeracion de datos del Grupo Agua	98
Cuadro 15 Historial de Conglomeracion de datos completos de todas las fuentes y sitios de muestreo	104

ABREVIATURAS Y UNIDADES DE MEDIDA

ADN	Acido desoxirribonucleico
AIEC	<i>E coli</i> de Adherencia Invasiva
APHA	<i>American Public Health Association</i>
AWWA	<i>American Water Works Association</i>
ARN	Acido ribonucleico
Aw	Actividad de agua
A/E	Adherencia y esfacelamiento
AA	Adherencia agregativa
Bfp	Pilis o fimbrias rizadas
CO₂	Dioxido de carbono
ColE1	Plasmidos de colicinas
CFA	<i>Colonization factor antigens</i>
CFSPH	<i>Center for Food Securty & Public Health</i>
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
cGMP	<i>Cyclic guanosine monophosphate</i>
DAEC	<i>E coli</i> de Adherencia Difusa
Debris	Detritos
ECOR	Coleccion de cepas de referencia de <i>E coli</i>
EDTA	Acido etilendiaminotetraacetico
ETEC	<i>E coli</i> Enterotoxigenica
EHEC	<i>E coli</i> Enterohemorragica
EIEC	<i>E coli</i> Enteroinvasiva
EPEC	<i>E coli</i> Enteropatogena
EAEC	<i>E coli</i> Enteroagregativa
ERIC	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus</i>
F	Plasmido de factores sexuales
FDA	<i>Food Drug Administration</i>
GC	Guanina citocina

H₂S Acido sulfhídrico
H₂ Hidrogeno
IRUs *Intergenic repeat units*
Kb Kilobase
KDa KiloDaltones
Km Kilometro
MUG 4 *metilumbelliferyl-beta-D glucoronide*
MLEE Electroforesis de enzima multilocus
Mb Megabases
Mbp Millones de pares de bases
MDa MegaDaltones
mm Milímetros
mg Miligramos
ml Mililitros
mM Milimol
NaCl Cloruro de sodio
NMP Numero mas probable
OMP *Outer membrane proteins*
ORFS Marcos de lectura abierta
pH Potencial de hidrogeno
PCR *Polymerase Chain Reaction* (Reaccion en cadena de la polimerasa)
pb Pares de bases
rpm Revoluciones por minuto
R Plasmido de resistencia a antibioticos
SIDA Sindrome de inmuno-deficiencia adquirida
SDS *Sodium dodecyl sulfate*
SUH Sindrome uremico hemolitico
Stx Toxina Shiga
TA Temperatura ambiente
TE Solucion amortiguadora de pH

TSD Tecnología de sustrato definido
UFC Unidades formadoras de colonias
UV Ultravioleta
UPGMA *Unweighted pair group method with arithmetic averages*
USEPA *United States Environmental Protection Agency*
WEF *Water Environment Federation*
WHO *World Health Organization*
M Molaridad
°C Grado centígrado
µg Microgramos
µm Micrómetros
µl Microlitros

RESUMEN

La *E. coli* tradicionalmente ha sido utilizada como un indicador de contaminación fecal en aguas y alimentos. Los avances en métodos de genotipificación de ADN y perfiles de resistencia a antibióticos han resultado de gran utilidad para la caracterización de aislados de *E. coli* con respecto a la fuente hospedera. La ERIC-PCR (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*) es una técnica utilizada para la genotipificación de muchas bacterias ambientales y patógenas. Los objetivos de este estudio fueron el de determinar por la técnica de ERIC-PCR si existe o no clonalidad entre 117 cepas de *E. coli* aisladas de tres comunidades (Ciudad del Niño, El Arado y Escobal) y cinco fuentes diferentes (heces de gallinas, cerdos, vacas y humanos, y de aguas) y determinar la presencia de plásmidos en 112 de estas cepas por aislamiento de ácidos nucleicos. Los resultados de la genotipificación indicaron que las cepas de *E. coli* ambientales y comensales mostraron una elevada diversidad de perfiles ERIC. Las cepas de *E. coli* que se aislaron de un mismo individuo o fuente mostraron diferentes patrones de bandas en el ERIC al igual que las cepas que se aislaron de las diferentes comunidades. El 70.5% de las cepas de *E. coli* evaluadas resultaron positivas para ADN plasmídico. La prevalencia de plásmidos fue de un 44.3% en la comunidad de Ciudad del Niño, 31.6% en la comunidad de Escobal y 24.1% en la comunidad de El Arado. En conclusión, se encontró mucha heterogeneidad entre las cepas de *E. coli* aisladas de individuos diferentes y entre las comunidades. Esto podría indicar que las cepas de *E. coli* se están movilizándose entre las comunidades de la zona y que estas cepas tienen orígenes diversos.

ABSTRACT

E. coli has traditionally been used as an indicator of fecal contamination in water and food. Advances in DNA genotyping methods and antibiotic resistance profiles have proved very useful for the characterization of *E. coli* isolates with respect to the host source. ERIC-PCR (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*) is a technique used for the genotyping of many environmental and pathogenic bacteria. The objective of this study was to determine whether or not clonality exists between 117 strains of *E. coli* isolated from three communities (Ciudad del Niño, El Arado and Escobal) and five different sources (chicken, pig, cow and human faeces and water) and to determine the presence of plasmids in 112 of these strains by nucleic acid isolation. The genotyping results indicated that environmental and commensal *E. coli* strains showed a high diversity of ERIC profiles. *E. coli* strains that were isolated from the same individual or source showed different bands patterns in the ERIC, as well as strains that were isolated from different communities. 70.5% of the strains of *E. coli* evaluated were positive for plasmid DNA. The prevalence of plasmids was 44.3% in the community of Ciudad del Niño, 31.6% in the community of Escobal and 24.1% in the community of El Arado. Escobal water samples had the highest prevalence of plasmids with 32%, followed by faecal samples from El Arado humans with 31.6% and finally fecal samples from Escobal chickens with 28%. In conclusion, much heterogeneity was found between strains of *E. coli* isolated from different individuals and between communities. This could indicate that strains of *E. coli* are being mobilized among communities in the area and that these strains have diverse origins.

INTRODUCCIÓN

La calidad de las aguas superficiales usadas para el consumo humano recreacion e irrigacion se ha deteriorado debido al incremento de la contaminacion fecal producto de las actividades humanas Las descargas fecales de humanos en las aguas superficiales se han considerado un riesgo a la salud publica debido a que la mayoria de los patogenos entericos tales como *Salmonella spp* *Escherichia coli* (*E coli*) patogenicas *Shigella spp* virus de la hepatitis A y norovirus son transmitidos a traves de la ruta oro-fecal (Scott *et al* 2002) Ademias la emergencia de patogenos entericos zoonoticos en aguas superficiales tales como *Cryptosporidium* *Giardia* *Campylobacter* y *E coli* O157 H7 (serotipo mas importante de *E coli* Enterohemorrágica) tambien representa un riesgo a la salud publica (WHO 2003)

Durante muchos años se ha utilizado a la *E coli* como un microorganismo indicador de contaminacion fecal en ambientes acuaticos debido a que es una de las especies dominantes en las heces humanas La *E coli* es un bacilo Gram negativo que reside en el tracto intestinal de humanos y animales de sangre caliente la cual representa 0.1 a 5 % de la flora bacteriana total (Blount 2015)

Las Regulaciones de calidad del agua de la USEPA para consumo humano irrigacion y uso recreacional estan basadas en la concentracion de esta bacteria La presencia de *E coli* en aguas primariamente proporciona evidencia de una contaminacion fecal reciente y secundariamente refleja la posible presencia de bacterias virus y parasitos patogenos de origen enterico (APHA AWWA y WEF 2012) Sin embargo su presencia o incremento en densidad no proporciona ninguna informacion acerca de la fuente de contaminacion fecal El conocimiento de la fuente de contaminacion fecal su destino y ecologia en el ambiente son necesarios para la evaluacion de riesgos a la salud humana y animal y a la remediacion de las fuentes de aguas contaminadas

Por otra parte el uso de *E coli* como indicador descansa parcialmente sobre la nocion de que no persiste o crece en el ambiente Sin embargo se ha reportado que algunas cepas de *E coli* provenientes del suelo son geneticamente distintas

de aquellas aisladas de fuentes animales conocidas (Byappanahalli *et al* 2006 Ishii *et al* 2006) e idénticos genotipos de esta bacteria están presentes en el suelo por un periodo de dos años (Sadowsky y Matteson 2010). Varios estudios han reportado la persistencia y potencial crecimiento de *E. coli* en aguas, sedimentos, suelos y en asociación con algas macrofitas (Fujioka *et al* 1999, Solo-Gabriele *et al* 2000, Whitman *et al* 2003, Byappanahalli *et al* 2003, Byappanahalli *et al* 2006, Ishii *et al* 2006, Ishii *et al* 2007, Ksoll *et al* 2007, Ishii *et al* 2010, Brennan *et al* 2010, Sadowsky y Matteson 2010, Goto y Yan 2011, Halliday y Gast 2011, Byappanahalli *et al* 2012, Berthe *et al* 2013). Estas cepas se han denominado como *E. coli* naturalizadas (Ishii *et al* 2006).

Resultados de varios estudios han demostrado que cepas específicas de *E. coli* se han naturalizado o están presentes como miembros estables de la comunidad microbiana y pueden contribuir a elevados recuentos a través de la inoculación del agua por escorrentías del suelo y arena y por sedimentos mezclados en la columna de agua (Whitman y Nevers 2003, Ishii *et al* 2007). La presencia de *E. coli* indígena en aguas, suelos y sedimentos confunde el uso de esta bacteria como un indicador de contaminación fecal. Por lo tanto, el conocimiento de las características ecológicas de esta bacteria en estas matrices es importante para su validación como organismo indicador.

Estudios realizados con Electroforesis de Enzima Multilocus (MLEE) para investigar la estructura genética de las poblaciones naturales de *E. coli* concluyeron que esta población es esencialmente clonal en la naturaleza y experimenta eventos de recombinación infrecuentes (Milkman 1997). Esta recombinación es un proceso importante en la estructura genética de la población de *E. coli*. Factores de virulencia pueden ser transmitidos verticalmente dentro de clones resultantes o ser transmitidos horizontalmente a otros linajes como parte de los bloques de genes de virulencia conocidos como islas de patogenicidad (Johnson *et al* 1998). El grado de clonalidad dentro de la población natural y la influencia del nicho ecológico sobre la selección de los

clones aun tienen que ser claramente definidos. Por lo tanto existe la necesidad de realizar investigaciones de *E. coli* en animales reservorios y ambientes naturales para determinar la variabilidad genética de las poblaciones y proporcionar información importante en términos ecológicos y epidemiológicos (Olive y Bean 1999, Anderson *et al* 2006, Ishii *et al* 2006, Brennan *et al* 2010).

Varias técnicas moleculares pueden identificar diferencias en la composición genética de una población microbiana. Algunas de ellas se basan en la digestión con enzimas de restricción de productos de PCR. Polimorfismos de fragmentos largos de restricción (PCR-RFLP) (Aslam *et al* 2003), polimorfismo del ADN de amplificación al azar (RAPD) (Vogel *et al* 2000), polimorfismo de fragmentos largos amplificados (AFLP) (Leung *et al* 2004), ribotipificación (Carson *et al* 2001, Carson *et al* 2003, Anderson *et al* 2006), electroforesis en gel de agarosa con campo pulsado (PFGE) (Casarez *et al* 2007), PCR 16S ARNr (Sander *et al* 1998) y el PCR basado en secuencias repetitivas (REP-PCR, *repetitive extragenic palindromic*-PCR) (Dombek *et al* 2000, Johnson y OBryan 2000, Dias da Silveira 2002, Dos Santos Borges *et al* 2003, McLellan *et al* 2003, McLellan 2004, Johnson *et al* 2004, Baldy-Chudzik y Stosik 2005, Mohapatra *et al* 2007). El REP-PCR genera patrones de bandas de cepas específicas obtenidos por la amplificación de elementos de ADN repetitivos presentes a lo largo del genoma bacterial. Las secuencias repetitivas conservadas se dividen en cuatro tipos: REP, ERIC, politrinucleótidos cortos tales como los GTG₅ y el elemento BOX. Las secuencias ERIC están presentes en muchas copias en los genomas de *E. coli*, *Salmonella typhimurium* y otras enterobacterias (Hulton *et al* 1991, Wilson y Sharp 2006). El método de ERIC-PCR tiene la ventaja práctica de ser más sencillo, más rápido y menos costoso que otros métodos de tipificación (Leung *et al* 2004).

Los objetivos de este trabajo fueron caracterizar la diversidad genética de cepas de *E. coli* y determinar la presencia de plásmidos en muestras de heces.

humanas animales (vacas pollos cerdos) y de aguas provenientes de tres poblados diferentes de Panama (El Arado-Provincia de Panama Oeste Ciudad del Niño- Provincia de Panama Oeste y Escobal- Provincia de Colon) Los patrones de huella genetica obtenidos seran evaluados por la construccion de un dendrograma para determinar el grado de similitud

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Taxonomía y características microbiológicas de *E. coli*

En 1885 Theodor Escherich un pediatra alemán describió por primera vez una bacteria aislada de las heces de los neonatos y niños sanos la cual denominó *Bacterium coli commune*. Posteriormente Castellani y Chalmers (1919) la denominaron *E. coli* en su homenaje. Por muchos años se consideró un organismo comensal del intestino grueso. Sin embargo, hubo reportes ocasionales de que actuaba como un organismo patógeno. Dulaney y Michelson (1935) fueron los primeros en demostrar que una cepa de *E. coli* era la causante de un brote de diarrea entre neonatos (Bettelheim 1992).

Desde entonces esta bacteria es uno de los seres vivos más estudiados en el mundo. La mayoría de las cepas de *E. coli* son inócuas formando parte de la flora normal del tracto gastrointestinal de animales de sangre caliente incluyendo al hombre. Sin embargo, hay cepas patógenas que causan serias enfermedades diarreicas debido a que poseen factores de virulencia tales como enteroadhesinas o enterotoxinas (Leclerc *et al.* 2001). Las enfermedades diarreicas han ocasionado la muerte a aproximadamente 760 000 niños menores de cinco años por año (WHO 2013). La *E. coli* es uno de los agentes etiológicos de diarrea en ciudades en desarrollo (WHO 2013). También pueden actuar como patógenos oportunistas causando infecciones en hospederos inmunocomprometidos o debilitados o cuando las barreras gastrointestinales son violadas (Nataro y Kaper 1998, FDA 2002).

La cepa de referencia *E. coli* K-12 y sus derivados han sido clave en el avance de la genética, biología celular, biología molecular, fisiología y bioquímica. También ha sido utilizada como organismo modelo en estudios de evolución experimental, especiación, adaptación bacteriana y genética de poblaciones para entender la acción de las diferentes fuerzas evolutivas a corto y largo plazo. Además, ha sido el candidato perfecto para estudiar la transición entre comensalismo y patogenicidad (Tenaillon *et al.* 2010). Su genoma entero se conoce desde hace algunos años (Blattner *et al.* 1997).

Segun el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Krieg 1984) son bacterias Gram negativa cilíndricas con 1 1 1 5 μm de diametro por 2 0 6 0 μm de largo que se disponen aisladas o en parejas

De acuerdo a la definicion general de la familia *Enterobacteriaceae* a la que pertenecen son bacterias Gram negativas no formadoras de esporas en forma de bastones que a menudo son moviles por flagelos peritricos o inmoviles La capsulacion puede ocurrir y normalmente reducen nitrato a nitrito y no producen H_2S Son quimioheterotrofos facultativos teniendo los metabolismos fermentativo y respiratorio Cuando crecen fermentativamente sobre glucosa u otros carbohidratos producen acido y gas (principalmente H_2 y CO_2) La mayoria de las cepas son citrato oxidasa y ureasa negativo y producen catalasa y β -galactosidasa (Krieg 1984)

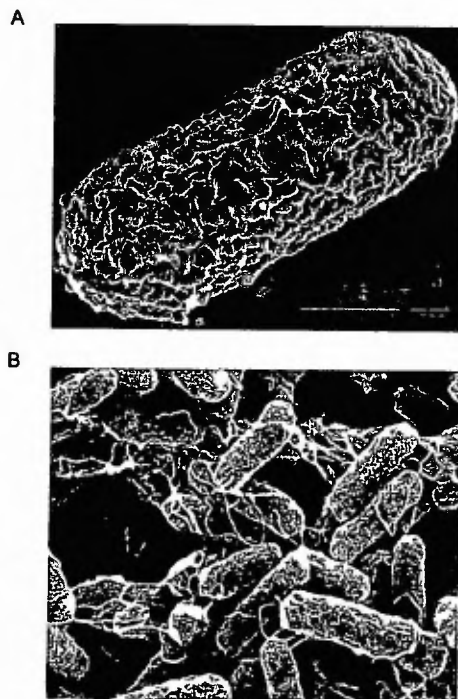


Figura 1 Micrografías electrónicas de barrido de *E. coli* A) *E. coli* B cepa REL606 cepa de laboratorio con una morfología típica en forma de bastón B) *E. coli* O119 HND cepa A111 cepa enteropatógena que produce pili en forma de cabello (Tomado de Z Blount 2015)

Para las tradicionales pruebas bioquímicas de un laboratorio clínico la *E. coli* es positiva para la producción de indol y la prueba de rojo de metilo Las pruebas diferenciales clásicas para separar primariamente *E. coli* de *Shigella* y

Salmonella es la habilidad para fermentar la lactosa ya que estos dos generos no la pueden realizar (Paiva de Souza 2006) La mayoría de las cepas de *E coli* tambien pueden fermentar D-manitol D-sorbitol L-arabinosa maltosa D-xilosa trihalosa y D-manosa La mayoría de las cepas son capaces de crecer sobre un amplio rango de temperatura (aproximadamente 7 – 48 °C) El rango de crecimiento maximo esta en un rango estrecho de 37 - 42 °C La temperatura optima de crecimiento es de 37-38°C Esta bacteria puede crecer dentro de un rango de pH de aproximadamente 5.5 – 8.0 con un mejor crecimiento a un pH neutro Algunas cepas de *E coli* O157 H7 tienen la habilidad de tolerar la exposicion a pH menores de 4.0 y pueden proliferar en alimentos con una actividad de agua (Aw) minima de 0.95 (Leyer et al 1995 Tilden et al 1996)

Ademas de la *E coli* hay otras especies dentro del genero *E hermannii* *E blattae* *E vulnens* *E albertii* y *E fergusonii* (Fig 2) Poco se conoce sobre la biologia y distribucion de estas especies Las cepas de *E blattae* *E vulnens* y *E hermannii* estan lejanamente relacionadas a otras *Escherichia* y no son miembros validos del genero (Walk et al 2009) La inclusion de *E blattae* al genero estuvo basada en la similitud fenotipica con *E coli* y a pesar de la existencia de al menos 4 reacciones bioquimicas incongruentes esta especie permanece dentro del genero *Escherichia* Estudios realizados con Hibridizaciones de ADN (1982) sobre pequeños numeros de aislados demostraron que *E hermannii* y *E vulnens* comparten una similitud genética minima (~39%) con *E coli* comparados con otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Walk et al 2009)



Figura 2 Fotomicrografías electrónicas de *E. blattae* (A) *E. coli* (B) *E. fergusonii* (C) *E. Herman* (D) y *E. vulnens* (E) Barra = 1 μ m (Tomado de Scheutz yStrockbine 2005 En Faleiro 2010)

Un sistema de subdivision comun de *E. coli* pero no basado en relacion evolutiva es por el serotipo el cual esta basado por los antigenos de superficies [flagelares (H) y somaticos (O y K)] En 1940 Kauffman desarrollo este esquema de serotipificacion para determinar el grupo patogeno al que pertenecen las cepas de *E. coli* Actualmente se conocen mas de 180 antigenos O 60 H y 80 K (Robins-Browne y Hartland 2002 En Stenutz *et al* 2006) Cada antigeno O define un serogrupo y una combinacion especifica de antigenos O y H define el serotipo de un aislado La serotipificacion es una importante herramienta la cual puede ser utilizada en combinacion con otros metodos para distinguir cepas de *E. coli* patogenicas que poseen atributos de patogenicidad especificos que son vinculados a ciertos serotipos (Nataro y Kaper 1998)

Como integrante de la flora normal del hombre y de muchos animales se le considera un organismo indicador de contaminacion fecal cuando esta presente en el agua y alimentos Por lo tanto la deteccion de esta bacteria puede ser utilizada para evaluar la calidad sanitaria de los alimentos asi como en el agua

y es considerado como un organismo indicador de la posible presencia de patógenos entericos (FDA 2002 APHA AWWA y WEF, 2012)

Las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* se caracterizan por ser capaces de respirar facultativamente en el interior del intestino y en el ambiente exterior. Gracias a esta capacidad muchos de los miembros de esta familia son de vida libre encontrándose secundariamente en el suelo, sedimento y agua, mientras que otros tantos son principalmente comensales de animales invertebrados y vertebrados o son patógenos de plantas o vertebrados. Adicionalmente es posible encontrar poblaciones de *E. coli* en vertebrados de sangre fría (Gordon y Cowling 2003). De este modo, la *E. coli* es fisiológicamente versátil y se adapta bien a diferentes hábitats respondiendo a estímulos químicos, temperatura, pH, osmolaridad, etc. (Sousa 2006, Ishii y Sadowsky 2008, Van Elsas *et al.* 2011).

1.2 Filogenia

Con el análisis del ARN de la *E. coli* permite ubicarlo al Phylum *Proteobacteria* y a la Clase *Gammaproteobacteria* (γ) misma que se encuentra muy relacionada a las otras proteobacterias (α , β , δ) y a las cianobacterias. La Clase de *Proteobacteria* γ incluye además a organismos patógenos de humanos como son *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio* y *Haemophilus*. El análisis comparativo de secuencias de ARN ribosomal 5S y 16S sugiere que la *E. coli* y *Salmonella enterica* compartieron un antepasado común hace 120 a 160 millones de años, lo cual coincide con el origen de los mamíferos (Ochman y Wilson 1987, En Bergthorsson y Ochman 1998).

La *E. coli* y *Shigella* han sido históricamente separadas en diferentes géneros dentro de la familia *Enterobacteriaceae*. Por ejemplo, en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* la sección de la filogenia de *Shigella* comienza con la siguiente oración: Evidencia científica acumulada hasta la fecha soporta fuertemente que las especies de *Shigella* son patotipos/biotipos o clones de *E.*

coli (Strockbine y Maurelli 2005 En Lukjancenko *et al* 2010) Los analisis de las secuencias de ADN de sus genomas revelan un alto grado de similitud y sugieren que deberian formar una unica especie (Fig 3) Experimentos con electroforesis de enzima multilocus (MLEE) concluyeron que casi todas las especies de *Shigella* son clones dentro de la especie *E coli* (Pupo *et al* 1997 En Lukjancenko *et al* 2010)

La *Shigella* ha sido postulada como genero por su capacidad de generar una diarrea invasiva especifica estrictamente en humanos y por sus caracteristicas bioquimicas (Touchon *et al* 2009) De modo que la conveniente distincion entre estos generos es mantenida por el consenso de la mayoria de los bacteriologos Similarmente otras cepas de *E coli* (por ejemplo la cepa K-12) son geneticamente muy diferentes y ameritan que las reclasifiquen

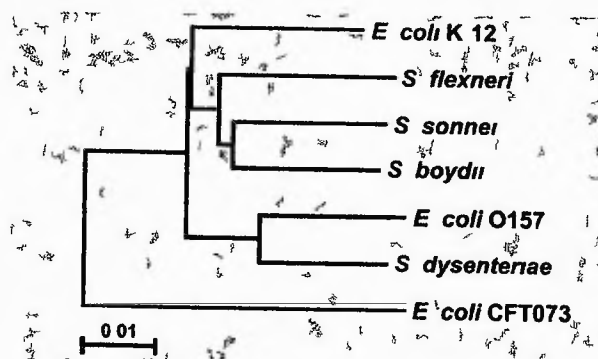


Figura 3 Relacion aproximada entre cepas de *E coli* y *Shigella* de un análisis de agrupamiento de distancias a sitios cuatro veces degenerados en 21 genes La escala indica 0.01 diferencias por sitio (Tomado de Wilson y Sharp 2006)

Estudios evolutivos basados sobre el analisis de las secuencias de ADN o la MLEE han identificado seis diferentes grupos filogeneticos denotados A B1 B2 C D y E (Bettelheim 1992 Touchon *et al* 2009) Los grupos A B1 B2 y D son los principales y los grupos C y E son los minoritarios La prevalencia de los cuatro principales grupos filogeneticos en varias poblaciones humanas y animales es la siguiente en humanos las cepas del grupo A son predominantes (40.5 %) seguido por las cepas del grupo B2 (25.5%) mientras que las cepas de

los grupos B1 y D (17% cada uno) son menos comunes. En animales dominan las cepas del grupo B1 (41%) seguido por las del grupo A (22%), B2 (21%) y D (16%) (Tenailon *et al* 2010). La mayoría de los clones de cepas comensales aisladas de heces de humanos sanos pertenecen a los grupos A y B1 (Picard *et al* 1999). Aunque no existen estudios que caractericen aislados de *E. coli* provenientes de animales no domesticados, la evidencia disponible señala que la mayoría de los aislados comensales de animales domésticos también pertenecen a los grupos A y B1 (Goullet y Picard 1986. En Gordon 2001).

Estudios filogenéticos han usado principalmente la Colección de Cepas de Referencia de *E. coli* (ECOR) como referencia para las comparaciones evolutivas (Ochman y Selander 1984). Esta colección de cepas constituida inicialmente por 72 cepas de *E. coli* aisladas de humanos y 16 cepas aisladas de otros mamíferos fueron seleccionadas para representar la diversidad completa de las especies maximizando la diversidad electroforética, la distribución geográfica y el rango del hospedero (Chaudhuri y Henderson 2012). Las cepas de estos grupos difieren en sus características fenotípicas que incluyen la habilidad de utilizar ciertos azúcares, perfiles de resistencia a antibióticos y relación entre rango de crecimiento y temperatura. Estos grupos filogenéticos comprenden saprofitos (A) y patógenos (B2 y D) (Van Elsas *et al* 2011).

Aunque estudios pioneros basados en los análisis de MLEE han mostrado que muchos clones tienen amplias distribuciones geográficas y de hospederos y una pequeña pero significativa proporción de la diversidad genética observada en *E. coli* depende de factores climáticos y geográficos (Escobar-Paramo *et al* 2004) y a características taxonómicas del hospedero (Souza *et al* 1999). La distribución geográfica explica solamente el 2% de la diversidad genética observada en *E. coli* aislada de dos poblaciones de ratones salvajes separadas a 15 km (Gordon 1997. En Gordon 2001). En un estudio realizado por Gordon y Lee (1999) de aislados de *E. coli* de mamíferos colectados por toda Australia se

observo que la localidad explico 5% de la diversidad alelica. Otro estudio realizado por Souza *et al* (1999) con aislados de *E coli* de roedores que viven en Australia y Mexico revelo que las diferencias entre continentes explican aproximadamente 10% de la diversidad observada. En las cepas de *E coli* procedentes de humanos la variacion entre familias dentro de la misma ciudad explico el 6% de la diversidad mientras que 1% fue atribuido a la variacion entre ciudades. En otro estudio realizado por Whittam *et al* (1983) con aislados humanos de *E coli* de cuatro continentes los efectos espaciales explicaron solamente el 2% de la diversidad alelica. Escobar-Paramo *et al* (2004) realizaron un estudio con cepas comensales de *E coli* en siete poblaciones distribuidas a nivel mundial y concluyeron que habia mas diversidad en la microbiota de *E coli* en areas tropicales que en areas templadas.

Basado en un numero muy limitado de estudios hay poca evidencia de que haya clones de *E coli* adaptados a especies hospederas o grupos hospederos particulares. En un estudio de *E coli* aisladas de cuatro ordenes y diez familias de mamiferos en Australia la familia taxonomica del hospedero explico solamente el 6% de la variacion genetica entre clones (Gordon y Lee 1999).

La dieta, la morfologia del intestino y el tamaño del cuerpo pueden tener una significativa influencia sobre la prevalencia y densidad de *E coli* entre hospederos mamiferos (Gordon y Cowling 2003).

1.3 *E coli* en el tracto intestinal

La *E coli* es un comensal del tracto intestinal bajo de los reptiles y animales de sangre caliente (Souza *et al* 1999, Gordon y Cowling 2003). La microbiota comensal del intestino de la cual forma parte la *E coli* contiene mas de 500 diferentes especies de bacterias que representan un total de 10^{10} a 10^{11} células por gramo de contenido intestinal (Tenailon *et al* 2010). Las cepas comensales de *E coli* que habitan el intestino grueso comprenden 0.1 a 5% de la biomasa total bacteriana (Blount 2015). Son los anaerobios facultativos mas abundantes.

en este ambiente En los humanos la concentracion de *E coli* por gramo de heces varia de 10^7 a 10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) y su prevalencia es mayor del 90% (Cuadro 1) En el intestino humano la poblacion incluye tipicamente cepas residentes por largos periodos y cepas transitorias que varian con la dieta salud y exposicion a antibioticos Estas cepas residen en un complejo biofilm multiespecies sobre la delgada capa mucosa que recubre las celulas epiteliales de todo el tracto intestinal (Blount 2015)

Las cepas comensales de *E coli* y su hospedero co existen en armonia por largos periodos de tiempo con mutuos beneficios para cada uno Una vez establecidas en el intestino una cepa puede persistir por meses o años (Sousa 2006)

Cuadro 1 Caracteristicas de *E coli* en la microbiota

Caracteristica	Humanos	Animales Domésticos	Animales Salvajes
Prevalencia (%)	> 90	No hay datos	10 – 55
Cantidad (UFC/g de heces)	10^7 10^9	10^4 10^6	No hay datos
Principal grupo filogenético	A (y B2)	B1	B1
Genes de virulencia extraintestinales	Comun	Raro	Raro
Grado de Resistencia a antibióticos*	18	11	0 7
Prevalencia de integrones (%)	16	7	0

UFC unidades formadoras de colonias El grado de resistencia está definido como $(R/n) \times 100$ donde n es el numero de cepas probadas A es el numero de antibióticos probados y R es la sumatoria del numero de cepas resistentes a cada antibiótico (Tomado de Skurnik *et al* 2006)

Las *E coli* pueden beneficiar a su hospedero en una relacion simbiotica produciendo vitamina B12 y K₂ (Blount 2015) y previniendo la colonizacion del intestino con bacterias patogenas a traves de la produccion de bacteriocinas y otros mecanismos (Tenailon *et al* 2010) Las cepas que colonizan el intestino compiten y crecen por los nutrientes que adquieren del mucus incluyendo al menos siete azucares del cual el gluconato parece tener un papel

predominante Aunque las concentraciones de estos azúcares en el intestino son bajas la *E coli* maximiza su crecimiento usando la respiración micro aerobia y anaerobia en el intestino (Tenaillon *et al* 2010)

La *E coli* es una de las primeras especies que coloniza al bebé recién nacido a las pocas horas de vida adquiriendo las cepas de la flora fecal de su madre durante el parto y/o del personal de maternidad (Blount 2015) El intestino humano es usualmente colonizado dentro de las 40 horas del nacimiento (Sousa 2006) Hasta un 11% de los bebés recién nacidos albergan *E coli* en la cavidad oronasal (Bettelheim 1992) En el intestino de los infantes esta bacteria alcanza una densidad de 10^9 UFC/g de heces Después de los dos años la densidad se estabiliza y permanece aproximadamente 10^8 UFC/g de heces hasta que gradualmente decrece con la vejez (Tenaillon *et al* 2010)

En general los hospederos que adquieren *E coli* durante el nacimiento mantienen posteriormente de una a dos cepas residentes y de tres a cuatro cepas transitorias Las cepas residentes se establecen por un largo periodo y más rápidamente después de una infección enterica o un tratamiento antimicrobiano que perturbe la microbiota normal (Sousa 2006) Las cepas transitorias cambian con el tiempo como resultado de la ingestión de alimentos o aguas contaminadas (Savageau 1983)

1.4 *E coli* en el ambiente

Savageau (1983) argumentó que la *E coli* tiene dos hábitats principales uno hábitat primario es el tracto intestinal bajo de los animales de sangre caliente y el otro llamado hábitat secundario es el ambiente (agua sedimento y suelo) Las células de *E coli* presentes en el contenido del colon son liberadas al ambiente a través de la deposición fecal Se ha estimado que las células vivas de *E coli* permanecen en promedio la mitad de su vida fuera de su hospedero en el hábitat secundario (Savageau 1983)

El habitat primario esta determinado por factores fisicos y geometricos complejos dieta del hospedero sistema inmune del hospedero estado fisiologico del hospedero y de las interacciones con otros microorganismos que se encuentren en la misma region (Savageau 1983)

El habitat secundario esta determinado por factores fisicos y geometricos asociados con el agua sedimento o suelo factores climaticos o meteorologicos disponibilidad de nutrientes y de otros microorganismos que integren el mismo ecosistema (Savageau 1983)

La *E coli* enfrenta stres ambiental cuando se expone a temperaturas altas y bajas humedad limitada variacion en la textura del suelo bajo contenido de materia organica alta salinidad radiacion solar altos a bajos niveles de oxigeno pH bajo alta osmolaridad y predacion (Ishii y Sadowsky 2008 Van Elsas *et al* 2011) Hasta hace poco se pensaba que la *E coli* sobreviviera pobremente en el ambiente y que no crecia en habitats secundarios tales como agua sedimento y suelo (Winfield y Groisman 2003) Sin embargo varios estudios han demostrado que la *E coli* puede sobrevivir por largos periodos de tiempo en el ambiente y replicarse potencialmente en el agua suelo sedimentos y sobre algas en ambientes templados tropicales y subtropicales si la disponibilidad de nutrientes y condiciones abioticas son favorables (Fujioka *et al* 1999 Solo-Gabriele *et al* 2000 Whitman *et al* 2003 Byappanahalli *et al* 2003 Byappanahalli *et al* 2006 Ishii *et al* 2006 Ksoll *et al* 2007 Ishii *et al* 2010 Brennan *et al* 2010 Sadowsky y Matteson 2010 Goto y Yan 2011 Byappanahalli *et al* 2012 Berthe *et al* 2013) Concentraciones altas de nutrientes humedad y temperaturas calidas en ambientes tropicales y subtropicales son factores probables que favorecen la supervivencia y crecimiento de *E coli* fuera del hospedero (Solo-Gabriele *et al* 2000 Winfield y Groisman 2003 Brennan *et al* 2010) La adicion de nutrientes tales como estiercol incremento grandemente la concentracion de *E coli* en un suelo en Ontario sugiriendo que esta bacteria

puede crecer y mantener su poblacion en ambientes templados si existen condiciones favorables (Topp *et al* 2003)

Se ha reportado tambien la presencia de *E coli* asociada a la macroalga *Cladophora* en el lago Michigan (Whitman *et al* 2003) al perifiton en el lago Superior (Ksoll *et al* 2007) y a epifitas sobre plantas terrestres en Puerto Rico (Rivera *et al* 1988 Bermudez y Hazen 1988) Tambien se ha reportado que cepas de *E coli* rapidamente colonizan crecen y mantienen su poblacion en arena de playa (Ishii *et al* 2007) La supervivencia y adaptacion en todos estos ambientes son necesarios para su continuo exito evolutivo La habilidad de *E coli* para sobrevivir y crecer en el ambiente es probablemente debido a su versatilidad en la adquisicion de energia (Ishii y Sadowsky 2008)

La *E coli* es una bacteria heterotrofica que requiere solamente fuentes simples de carbono nitrogeno fosforo sulfuros y otros elementos trazas para su crecimiento Puede crecer en un medio con glucosa como el unico constituyente organico Las cepas salvajes no poseen requerimientos de factores de crecimiento y metabolicamente pueden transformar la glucosa en todos los componentes macromoleculares que conforman la celula (Sousa 2006) Con un complejo mecanismo para regular el metabolismo esta bacteria puede sobrevivir a los quimicos de su ambiente sintetizando cualquier enzima necesaria para asimilar estos compuestos No produce enzimas para la degradacion de fuentes de carbono a menos que esten disponibles y no producen enzimas para la sintesis de metabolitos si ellos estan disponibles como nutrientes en el ambiente (Sousa 2006) Esta bacteria tambien puede degradar varios tipos de compuestos aromaticos tales como acido fenilacetico acido cinamico acido fenilpropionico y acido benzoico para adquirir energia (Diaz *et al* 2001) Ademias la mayoria de las cepas de *E coli* parecen haber conservado adaptaciones evolutivas claves en el nucleo de sus genomas tales como los sistemas de absorcion de hierro mediados por sideroforos o transportadores ABC para la toma de aminoacidos y azucares (Van Elsas *et al* 2011) Esto

sugiere una alta habilidad para obtener diversos nutrientes ayudando en la supervivencia en habitats secundarios. Por otro lado algunas cepas producen estructuras filamentosas que se extienden desde la superficie celular y ayuda a las células a sujetarse a superficies (por ejemplo superficies de plantas). Debido a esta habilidad puede ser aislada del suelo, estiércol o semillas contaminadas y puede colonizar plantas como lechuga y rabano (Van Elsas *et al* 2011). La *E coli* puede acceder a las raíces, superficies de hojas y compartimientos internos de la planta por irrigación o pulverización durante las lluvias.

En adición la *E coli* puede crecer bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Bajo condiciones anaeróbicas esta crece por medio de la fermentación produciendo gas y ácidos como productos finales. Por otro lado también puede crecer por medio de la respiración anaeróbica utilizando NO_3 , NO_2 o fumarato como aceptores finales de electrones en los procesos respiratorios de transporte de electrones (Sousa 2006). Esta bacteria crece sobre un amplio rango de temperatura ($7.5 - 49^\circ\text{C}$). Se ha reportado que sobrevive por largos periodos bajo temperaturas de congelación (Ishii y Sadowsky 2008). Byappanahalli *et al* (2006) reportaron que cepas de *E coli* repetidamente aisladas de suelos de bosques templados protegidos de Indiana presentaban diferentes estructuras genéticas de aquellas cepas aisladas de animales. Ishii *et al* (2006) reportaron resultados similares en suelos templados en Minnesota sugiriendo que estas cepas no fueron depositadas recientemente por animales.

La *E coli* puede responder a señales ambientales tales como pH, químicos, temperatura, osmolaridad y otros estimulantes. Por ejemplo esta bacteria puede sentir la presencia o ausencia de químicos y gases en su entorno y nadar hacia ellas o alejarse. Pueden detener el nado y crecerles fimbrias que atacan específicamente a una célula o receptor de superficie. En respuesta a cambios en temperatura y osmolaridad estas bacterias pueden variar el diámetro del poro de sus porinas de membranas externas para acomodar moléculas (nutrientes) más grandes o excluir (expulsar) sustancias inhibitorias (Sousa

2006). Esta bacteria puede utilizar una variedad de estrategias para sobrevivir y satisfactoriamente colonizar diferentes nichos. Algunos de los mecanismos bien caracterizados, utilizados por *E. coli*, para prosperar en el ambiente cambiante de los nichos intestinal y extraintestinal son factores de virulencia, resistencia a antibióticos y bacteriocinas (Riley y Gordon, 1999; Tenaillon *et al.*, 2010). Estos factores de adaptación son a menudo codificados por elementos genéticos móviles tales como plásmidos, integrones, transposones, islas genómicas, secuencias de inserción, entre otros. (Picard *et al.*, 1999; Gyles y Boerlin, 2014). La ganancia o pérdida de elementos genéticos móviles es responsable de la versatilidad de *E. coli* como un comensal y como un patógeno capaz de sobrevivir en un rango de ambientes dentro y fuera del hospedero (Gyles y Boerlin, 2014). La habilidad de estas bacterias para crecer y sobrevivir bajo diferentes condiciones, probablemente les permite integrarse a las comunidades microbianas como miembros “naturalizados” en una variedad de ambientes (Fig. 4) (Ishii y Sadowsky, 2008).

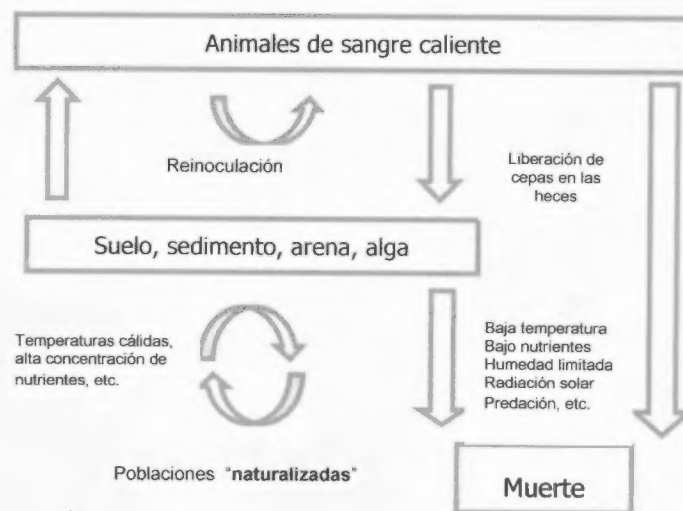


Figura 4. Diagrama del ciclo de vida de *E. coli*. Una vez es liberada de su hospedero primario (animales de sangre caliente) a través de las heces, la mayoría de las bacterias mueren debido a la baja concentración de nutrientes y otros factores ambientales. Sin embargo, algunas de ellas están adheridas al suelo, arena, sedimento o superficies de algas y logran sobrevivir. En algunas condiciones, estas cepas de *E. coli* pueden crecer y mantener sus poblaciones lo suficiente para adaptarse al ambiente. Las *E. coli* adaptadas o naturalizadas sobreviven y se replican en el ambiente, y pueden ser reintroducidas a los hospederos animales a través del contacto con el agua o alimento (Tomado de Ishii y Sadowsky, 2008).

1.5 *E. coli* como organismo indicador de contaminación fecal

El concepto de organismo indicador desarrollado en el último siglo para evaluar la contaminación fecal se basa sobre el hecho de que ciertos microorganismos no patógenos que están presentes en gran número en la flora intestinal de humanos y otros animales de sangre caliente y por lo tanto son encontrados en las heces fecales. La presencia de estos microorganismos no patógenos en el agua indica la potencial presencia de microorganismos patógenos de origen fecal y por consiguiente un riesgo para la salud pública. Las enfermedades relacionadas con el agua son la mayor causa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial (Ishii y Sadowsky 2008). Entre estas las enfermedades diarreicas causan aproximadamente 1.8 millones de muertes cada año mayormente en países en desarrollo (WHO 2004).

La detección y enumeración de muchos tipos de patógenos es difícil debido a su bajo número y requerimientos específicos de crecimiento. Además los métodos de identificación son bastante costosos, demandan tiempo y experticia técnica. La aplicación rutinaria de estos métodos aun no está lista y está restringida a estudios de investigación o a casos de brotes sospechosos (Field y Samadpour 2007).

Por lo tanto la herramienta más útil para determinar la potencial presencia de microorganismos patógenos en aguas es el análisis de los microorganismos indicadores. El microorganismo indicador ideal debe: 1) estar presente en las heces de humanos y animales de sangre caliente en gran número; 2) responder a procesos de tratamiento de modo similar a los patógenos fecales; 3) estar presente en mayor número que el patógeno; 4) ser capaz de sobrevivir de forma similar a los patógenos en el ambiente; 5) ser incapaz de multiplicarse en el ambiente; 6) ser detectado y cuantificado por métodos fáciles, rápidos y de bajo costo; y 7) no ser un patógeno (WHO 2004). Desafortunadamente ningún microorganismo indicador cumple con todos estos criterios.

Varios grupos de microorganismos han sido recomendados y usados como organismos indicadores de contaminacion fecal. Los coliformes totales, coliformes termotolerantes (fecales) y *E. coli* han sido utilizados casi por un siglo como indicadores de la seguridad bacteriológica del agua para consumo (Leclerc *et al* 2001). Otros organismos indicadores que se han utilizado son los *Enterococcus*, *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*), bacteriofagos, etc.

La *E. coli* fue propuesta como organismo indicador de agua para consumo primario en 1890 por Theobald Smith (Edberg *et al* 2000). Sin embargo, en esta época no había ninguna prueba específica para la detección de *E. coli*. Se requería de varios días y de un número de subcultivos para identificar esta bacteria. Eijkman (1904) desarrolló un método de detección altamente selectivo para *E. coli* basado sobre la fermentación de la lactosa a una temperatura elevada 44-46°C (Leclerc *et al* 2001). Luego, este método fue modificado con la eliminación de la elevada temperatura de incubación para así incluir a todos los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Esta prueba funcional, la cual incluía *E. coli* y otras bacterias, fue conocida como coliformes totales. En ese momento se razonó que si la mayoría de los eventos de contaminación de las aguas de consumo humano fuesen de origen fecal, el método de coliformes totales por lo tanto detectaría una alta proporción de *E. coli*. Desafortunadamente hoy en día se sabe que esto no es verdadero (Edberg *et al* 2000).

El grupo de coliformes totales ha sido criticado por muchos años y los resultados de varios estudios han demostrado que no son apropiados como indicadores de contaminación fecal en aguas para consumo humano. Estos microorganismos no reflejan adecuadamente la ocurrencia de patógenos en efluentes de aguas residuales desinfectadas porque son altamente susceptibles a la desinfección química y no tienen una clara correlación con parásitos protozoarios y virus entericos (Leclerc *et al* 2001, Harwood *et al* 2005, En Tyagi *et al* 2006). La falla de estos indicadores se ha demostrado por los recientes brotes de

criptosporidiosis. Además, los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Citrobacter* se encuentran ampliamente en el ambiente (aguas, suelos y vegetación) no están asociados con la contaminación fecal y no siempre están presentes durante brotes de enfermedades transmitidas por el agua. Numerosos estudios han documentado que coliformes como *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Klebsiella* colonizan frecuentemente el interior de las superficies de las cañerías de agua en los sistemas de distribución y tanques de almacenamiento creciendo en biofilms (recrecimiento) cuando las condiciones son favorables (Edberg *et al* 1986, Camper *et al* 1991, Edberg *et al* 1994, Blanch *et al* 2007). La presencia de coliformes totales en los sistemas de distribución y tanques de almacenamiento indica la degradación de la calidad del agua, posiblemente por el recrecimiento bacteriano y posible formación de biofilm o por contaminación después del tratamiento (WHO 2004, Health Canada 2012).

Para 1970 estuvo claro que la mayoría de las ocurrencias de coliformes totales en los sistemas de distribución de agua para consumo no eran *E. coli*. Además, los medios para identificar a esta bacteria estaban disponibles para laboratorios especializados y eran demasiado costosos, laboriosos y requerían alto nivel de expertise técnica para utilizarse como análisis de rutina. Por lo tanto, la prueba de coliformes fecales (termotolerantes) empezó a utilizarse para reemplazar la identificación de *E. coli*. Sin embargo, pronto se evidenció de que la gran mayoría de los coliformes fecales aislados de los sistemas de distribución de aguas no eran *E. coli*, sino coliformes termotolerantes miembros del género *Klebsiella*. Este género fue asociado con vegetación, productos agrícolas, pulpa de madera, efluentes de fábricas de papel que no estuvieron sujetos a contaminación fecal (Edberg *et al* 2000, Leclerc *et al* 2001).

La prueba de coliformes termotolerantes debe desarrollarse bajo un rango de temperatura exacto. Las temperaturas de incubación deben ser controladas rigurosamente aun en variaciones menores porque pueden producir errores en los datos. También, poblaciones grandes de heterótrofos interfieren tanto en el

metodo de filtracion como en el NMP. Además, muchas cepas de *E. coli* son incapaces de fermentar la lactosa resultando en falsos negativos (Edberg *et al* 2000)

Para finales de los años 80 varios estudios sustentaron el uso de una nueva tecnologia y un metodo para detectar e identificar directamente *E. coli* del agua de consumo. La Tecnologia del Sustrato Definido (TSD) contiene 4 *metilumbelliferyl-beta-D glucoronide* (MUG) el cual puede ser metabolizado por una enzima del sistema enzimatico de *E. coli*. Este sistema enzimatico β glucuronidasa esta presente en mas del 95% de todos los aislados de *E. coli*. Este metodo fue incluido en la edicion 19th del *Standar Methods for the Examination of Water and Wastewater* como el metodo de Sustrato Cromogenico. Los metodos de TSD permitieron por primera vez la deteccion y enumeracion de una unidad formadora de colonias de *E. coli* directamente de una muestra de 100 ml de agua, además es una prueba barata y no requiere experticia tecnica. Subsecuentemente un numero de metodos han sido desarrollados con sustratos cromogenicos para señalar o enumerar la presencia de *E. coli* en aguas (APHA 2005, Hamilton *et al* 2005, Prats *et al* 2008). De esta forma la TSD proporciono el impetu para re-insertar esta bacteria en las regulaciones de agua para consumo. La *E. coli* es uno de los indicadores fecales de eleccion recomendado en las Guías para la calidad del agua de consumo de la USEPA, WHO, European Union (EU) y Australian Drinking Water Guidelines (USEPA 2002, Tyagi *et al* 2006, WHO 2008).

1.6 Patotipos de *E. coli*

Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* son comensales del intestino de humanos y animales de sangre caliente, ciertas cepas patogenas específicas y altamente adaptadas son capaces de causar una variedad de enfermedades. Las infecciones debidas a las *E. coli* patogenicas pueden estar limitadas a la colonizacion de la superficie mucosa (diarrea, disenteria, colitis hemorrágica).

síndrome urémico hemolítico) o pueden diseminarse a través del cuerpo (infecciones urinarias bacteriemias o septicemias meningitis peritonitis abscesos mastitis infecciones pulmonares y de heridas) Por lo general las cepas de *E coli* patógenas utilizan múltiples mecanismos de manera similar a las otras bacterias que infectan mucosas con las etapas de adhesión y colonización de la mucosa evasión de los mecanismos de defensa multiplicación y daño tisular (Nataro y Kaper 1998) Varios patotipos de *E coli* han sido implicados en enfermedades diarreicas un problema de salud pública a nivel mundial con aproximadamente dos millones de muertes ocurriendo cada año (Sousa 2006)

En base a su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico las cepas de *E coli* causantes de diarrea se clasifican en siete grupos enterotoxigénica (ETEC) enterohemorrágica también conocidas como productoras de la toxina Verotoxina o toxina semejante a la Shiga (EHEC o VTEC o STEC) enteroinvasiva (EIEC) enteropatógena (EPEC) enteroagregativa (EAEC) adherencia difusa (DAEC) y adherencia invasiva (AIEC) (Nataro y Kaper 1998 Croxen *et al* 2013) Cada grupo tiene factores de virulencia específicos que sirven para su identificación y clasificación así como diferentes serotipos y serogrupos basados en los antígenos O y H (Nataro y Kaper 1998)

Todas las cepas patógenas contienen regiones genómicas (islas) cargadas con un grupo de genes de virulencia que codifican rasgos claves para la colonización/adherencia invasión secreción de componentes tóxicos y funciones de transporte así como la producción de sideróforos (Van Elsas *et al* 2011) La mayoría de los factores de virulencia adquiridos que distinguen las cepas patógenas de las cepas comensales son codificados por elementos genéticos móviles tales como plásmidos bacteriófagos y transposones (Croxen *et al* 2013)

1 6 1 *E coli* enterotoxigenica

Las *E coli* enterotoxigenicas (ETEC) pueden causar gastroenteritis infantil. El numero de reportes de su ocurrencia en paises desarrollados es pequeño sin embargo son causa importante de diarreas en lactantes y niños menores de dos años en ciudades menos desarrolladas (Maier *et al* 2000). Las ETEC son tambien la mayor causa de diarrea del viajero en personas de ciudades industrializadas que viajan a ciudades menos desarrolladas (Cabral 2010). Se estima que casi 840 millones de casos anuales de ETEC se reportan en paises en vias de desarrollo y aproximadamente 280 millones de estos casos son en niños de 0 a 4 años (Croxen *et al* 2013). La frecuencia de aislamiento de este grupo de patogenos en niños con diarrea es de 13%. Se ha estimado que 325 000 niños menores de 5 años mueren cada año debido a las enfermedades asociadas a las ETEC (Croxen *et al* 2013). Las infecciones de ETEC son transmitidas a traves de la ruta oro-fecal. La contaminacion fecal del agua y alimentos es la principal fuente de infeccion siendo la dosis infectiva de 10^8 UFC (Rodriguez-Angeles 2002). Los alimentos pueden ser contaminados por manipuladores de alimentos infectados o personas asintomaticas. Estas cepas tambien causan diarreas en animales. Los brotes significativos economicamente ocurren en terneros, cerdos y corderos recién nacidos (Paiva de Sousa 2006). Las *E coli* ETEC son usualmente especies especificas es decir que los humanos son los reservorios de las cepas que causan diarrea en humanos (Nataro y Kaper 1998).

Despues de un periodo de incubacion de 10 a 72 horas los sintomas incluyen calambres, vomitos, diarrea (generalmente sin sangre ni moco), postracion y deshidratacion. La diarrea producida puede ser leve, breve y autolimitada pero tambien puede ser grave. La enfermedad usualmente dura de 3 a 5 dias. Ademas, estas colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias que tienen diversas formas.

denominadas CFA (*colonization factor antigens*) siendo su principal mecanismo de patogenicidad la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas una termolabil y la otra termoestable (Rodríguez-Angeles 2002) Las toxinas aumentan el nivel intracelular de cAMP y cGMP respectivamente que se encuentran en la membrana de las células intestinales provocando la salida de agua e iones La enterotoxina termolabil que es uno de los principales factores de virulencia en este patógeno comparte similitud funcional y estructural con la toxina del *Vibrio cholerae* (Paiva de Sousa 2006)

1.6.2 *E. coli* enteropatógena

Las *E. coli* enteropatógenas (EPEC) son las causantes de una enfermedad diarreica confinada a infantes menores de dos años de edad en países en desarrollo (Nataro y Kaper 1998 Croxen *et al* 2013) Humanos vacas y cerdos pueden ser infectados por estos organismos Las EPEC son transmitidas de hospedero a hospedero por la vía oro-fecal y pocos brotes entre adultos ocurren a través de la ingestión de agua y alimentos contaminados sin embargo ningún reservorio ambiental específico ha sido identificado como la principal fuente de infección (Croxen *et al* 2013)

Los síntomas de la enfermedad incluyen diarrea acuosa con moco sin sangre vómito fiebre y deshidratación La dosis infecciosa en adultos voluntarios es alta entre 10^8 a 10^{10} organismos mientras la dosis requerida para causar enfermedad durante una infección natural es desconocida Los humanos son los únicos reservorios conocidos para la EPEC típica con niños asintomáticos y sintomáticos y adultos asintomáticos siendo la fuente más probable de infección (Croxen *et al* 2013)

Desde los años 60 las cepas de EPEC dejaron de ser una importante causa de diarrea infantil en Norte América y Europa Sin embargo son los

mayores agentes de diarrea infantil en Sur America Africa y Asia (Maier *et al* 2000)

El proceso de adherencia intima entre las bacterias que se adhieren a las celulas del intestino delgado produciendo la destruccion de las microvellosidades y la formacion de un citoesqueleto rico en actina que beneficia la union de la bacteria se denomina adherencia y esfacelamiento (A/E) (Rodriguez-Angeles 2002) La adherencia esta mediada por pilis o fimbrias rizadas que se llaman BFP cuya informacion genetica esta codificada en un plasmido de 50-70 Megadalton (MDa) denominado EAF (factor de adherencia de las EPEC) y de algunos genes cromosomales (Rodriguez-Angeles 2002)

La patogenesis de las EPEC es unica en los patogenos bacterianos entericos ya que no es invasiva y no produce ninguna toxina (Paiva de Sousa 2006) En ensayos *in vitro* las cepas EPEC se caracterizan por formar microcolonias en el citoplasma de las celulas Hep-2 (Rodriguez-Angeles 2002)

1 6 3 *E coli* enterohemorrágica

La *E coli* enterohemorrágica (EHEC) esta implicada en enfermedades transmitidas por los alimentos principalmente debido a la ingestion de hamburguesas de carne mal cocidas y leche cruda Estas cepas producen una o mas toxinas parecidas a la toxina Shiga producida por *Shigella dysenteriae* (Stx₁ Stx₂ y variantes Stx₂) Estas toxinas son su principal factor de virulencia y la produccion de las mismas depende de la presencia de un profago (virus bacteriano que inserta su ADN en un cromosoma bacteriano) La citotoxina Shiga (STx) actua a nivel de la sintesis de proteinas ya que se une a la subunidad 60S de los ribosomas de las celulas intestinales o renales del hospedero Ademas de las toxinas las

EHEC tienen otros mecanismos de patogenicidad como el fenómeno de adherencia y esfacelacion (A/E) y presentan el gen cromosomal *eae* que codifica para la proteina de membrana externa de 94 kilodaltones (kDa) llamada intimina. Otro factor de patogenicidad es el plasmido pO157 de 60 Megadaltones (MDa) que codifica para la enterohemolisina (Rodriguez-Angeles 2002)

La enfermedad usualmente incluye diarrea acuosa con intenso dolor abdominal seguida en unos dias por deposiciones con rastro de sangre, colitis hemorragica y síndrome uremico hemolitico (SUH). Generalmente los pacientes no presentan fiebre. El SUH es una importante causa de fallo renal agudo en niños y morbilidad y mortalidad en adultos. En los ancianos la tasa de casos por SUH puede ser tan alta como el 50%. El periodo de incubacion es de 3 a 4 dias y la enfermedad dura en promedio 8 dias. La *E coli* O157 H7 ha sido reconocida como una causa de este síndrome desde los años 1980. Una de las características mas remarcables es su baja dosis infectiva de 10-100 organismos (Paiva de Sousa 2006)

Los reservorios para la EHEC O157 H7 son rumiantes particularmente vacas y ovejas los cuales son infectados asintomaticamente y albergan los organismos en las heces (CFSPH 2009). Otros animales como conejos, gallinas, perros, gatos y cerdos pueden tambien transportar estos organismos. Los humanos adquieren las cepas EHEC O157 H7 por contacto directo con los animales reservorios, sus heces y agua o suelos contaminados o por la ingestion de hamburguesas de carne mal cocidas, otros productos animales y vegetales y frutas contaminados (CFSPH 2009). Tambien puede ser de persona a persona debida a manipuladores de alimentos (Nataro y Kaper 1998).

1 6 4 *E coli* enteroinvasiva

Las *E coli* enteroinvasivas (EIEC) mostraron que eran capaces de causar diarrea en estudios con voluntarios conducidos por DuPont *et al* (1971) (Nataro y Kaper 1998) Estas cepas estan bioquimica genetica y patogeneticamente relacionadas a *Shigella spp* Ambas causan una colitis inflamatoria invasiva pero tambien pueden provocar un sindrome de diarrea acuosa indistinguible de aquellas causadas por otras *E coli* patogenas (Paiva de Sousa 2006)

La patogenesis de la enfermedad causada por EIEC y *Shigella spp* involucra la invasion celular del epitelio del colon lisis de la vacuola endocitica multiplicacion intracelular movimiento direccional a traves del plasma y diseminacion a las celulas epiteliales adyacentes (Nataro y Kaper 1998) La informacion genetica para este mecanismo esta en el *loci* del cromosoma y del plasmido ademas de tener la capacidad de elaborar una o mas enterotoxinas que son importantes en la produccion de diarrea (ShET1 y ShET2) (Croxen *et al* 2013)

Las EIEC causan colitis inflamatoria invasiva y disenteria con una presentacion clinica (heces con sangre y moco acompañados por fiebre y calambres severos deshidratacion) identica a la enfermedad causada por especies de *Shigella*

Las EIEC/ *Shigella* invaden el epitelio intestinal principalmente en el intestino grueso Las cepas de EIEC se asocian mas con brotes que con casos aislados en los cuales la transmision puede ser de persona a persona por ingestion de alimentos y agua contaminada convirtiendose en un patogeno importante en niños mayores de seis meses (Rodriguez-Angeles 2002) La enfermedad es causada por una dosis infecciosa de 10 a 100 UFC de *Shigella* en voluntarios (Croxen *et al* 2013)

Ningun episodio ha sido reportado en recientes programas de vigilancia gubernamentales de salud en los Estados Unidos (EEUU) Europa y Australia En la ultima decada solo unos cuantos episodios de EIEC con mas de 10 casos han sido reportados en estudios de Centro y Sur America Africa y Asia (Croxen *et al* 2013) Un estudio (1999) estimo que 164 7 millones de episodios de *Shigella* se dan anualmente 99% afectando paises en desarrollo incluyendo 1 1 millones de muertes por año (Croxen *et al* 2013) Aproximadamente dos tercios de los episodios y muertes son en niños menores de 5 años (Croxen *et al* 2013)

1 6 5 *E coli* enteroagregativa

La *E coli* enteroagregativa (EAEC) fue descrita por primera vez en 1985 por Scaletsky y Nataro y fue reconocida por su distintiva adherencia a las celulas HEp 2 en un patron semejante a bloques aglutinados (Harrington *et al* 2006) Este patron de adherencia distinto a los patrones de adherencia manifestados por EPEC y DAEC fue significativamente asociado con diarrea en niños en Chile en 1987 (Harrington *et al* 2006) Las EAEC estan implicadas en diarreas endemicas de infantes en paises industrializados y en desarrollo diarreas persistentes entre pacientes con SIDA y diarreas del viajero (Croxen *et al* 2013) La transmision de la diarrea del viajero ocurre mayormente por la ingestion de agua y alimentos contaminados Los manipuladores de alimentos pueden ser transportadores de EAEC Estudios de laboratorio posteriores revelaron que el fenotipo de adherencia agregativa (AA) se caracteriza por la autoaglutinacion de las bacterias entre si y por ser inespecifica ya que las bacterias se adhieren a la superficie de cubreobjetos libres de celulas Hep 2 (Nataro y Kaper 1998)

La estrategia basica de las EAEC comprende la colonizacion de la mucosa intestinal probablemente la del colon seguido por la secrecion de

enterotoxinas y citotoxinas y la induccion de la inflamacion de la mucosa (Nataro *et al* 1998 Croxen *et al* 2013) Las toxinas incluyen Pet una toxina que altera el citoesqueleto EAST-1 enterotoxina estable al calor ShET1 subunidad de una toxina que parece inducir el AMP ciclico (cAMP) y el cGMP- mediando la secrecion y Pic una mucinasa compartida entre muchas diferentes cepas de *Shigella* y *E coli* patogenicas (Croxen *et al* 2013) El cuadro clinico de la infeccion comprende diarrea acuosa ocasionalmente con o sin sangre y con moco y sin fiebre El sitio blanco del daño de EAEC puede ser la mucosa del intestino grueso y delgado con un periodo de incubacion de menos de 8 hr y puede durar hasta 18 o 20 dias (Rodriguez Angeles 2002)

1 6 6 *E coli* de adherencia difusa

La *E coli* de Adherencia Difusa (DAEC) es una categoria de cepas que producen una adherencia difusa en el ensayo de celulas Hep-2 (Nataro *et al* 1998) En este patron de adherencia difusa la bacteria cubre uniformemente toda la superficie celular No forma microcolonias cuando se adhieren a las celulas Hep-2 Se sabe poco de su mecanismo de patogenicidad pero se ha caracterizado una fimbria de superficie designada F1845 involucrada en el fenomeno de adherencia difusa Los genes que codifican la fimbria se pueden encontrar en el cromosoma o en un plasmido (Paiva de Sousa 2006) La adherencia difusa tambien se ha asociado con una proteina de membrana externa de 100 Kilodaltones KDa en una cepa del serotipo O126 H27 (Rodriguez Angeles 2002) Pocos estudios clinicos y epidemiologicos se han llevado a cabo para describir adecuadamente la epidemiologia y los aspectos clinicos de la diarrea causada por DAEC Las DAEC se pueden aislar tanto de personas sanas como en personas con diarrea siendo mas importante en niños de 4 a 5

años Los principales síntomas que se presentan son diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos (Rodríguez Ángeles 2002)

1 6 7 *E coli* de adherencia invasiva

La *E coli* de Adherencia Invasiva (AIEC) ha sido implicada como uno de los agentes causantes de la Enfermedad de Crohn la cual es causa de la Enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) principalmente el intestino delgado No existe un unico agente causal de la Enfermedad de Crohn identificado y la hipotesis actual sostiene que esta enfermedad es causada por una combinacion de factores geneticos microbiota intestinal factores ambientales y patogenos entericos (Croxel *et al* 2013) Las características de la Enfermedad de Crohn son inflamacion irregular lesiones sobre el grosor de la pared intestinal y granulomas (Conte *et al* 2014) La etiologia de esta enfermedad aun no ha sido completamente elucidada aunque se acepta que la inflamacion cronica es debido a respuestas inmunes irregulares hacia la microbiota intestinal Una composicion desbalanceada de la microbiota intestinal (disbiosis) localizada o generalizada ha sido reportada en pacientes con la Enfermedad de Crohn y se tiene la hipotesis de que la perdida o reduccion en el numero de microorganismos beneficiosos puede favorecer la colonizacion de microorganismos patogenos altamente agresivos (Conte *et al* 2014) Los patogenos asociados incluyen *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* *Campylobacter* species cytomegalovirus y AIEC El patotipo AIEC no expresa los factores de virulencia comunes encontrados en otras cepas de *E coli* patogenicas y la base genetica para su fenotipo invasivo y proinflamatorio no es completamente entendido (Croxel *et al* 2013) La organizacion del genoma AIEC es similar al de otras cepas de *E coli* patogenicas con grandes regiones del genoma nucleo interrumpido con islas genomicas adquiridas probablemente por transferencia horizontal

La presencia de 35 islas genómicas probablemente represente los determinantes genéticos que cuenta el patotipo AIEC para contribuir a la adherencia, invasión y supervivencia intracelular bacteriana. La secuenciación del genoma ha ayudado a la identificación de 4 potenciales determinantes de virulencia: primero, un sistema de secreción tipo VI el cual es utilizado por bacterias Gram negativas para exportar proteínas a través de membrana celular y se cree que sostiene la supervivencia intracelular; segundo, varios genes que codifican adhesinas, específicamente Pili Tipo I, la proteína terminal FimH, la cual es importante para la adhesión al epitelio intestinal y la fimbria polar alargada que juega un papel importante en la invasión; tercero, varios reguladores transcripcionales de genes de virulencia y finalmente genes involucrados en la adquisición de hierro.

Varios estudios clínicos han encontrado AIEC en aproximadamente 30% de los pacientes con la enfermedad de Crohn (Croxen *et al* 2013). Estudios epidemiológicos han mostrado que la incidencia y prevalencia está aumentando en todos los grupos étnicos del mundo desarrollado, sin embargo, la incidencia más elevada es en Norteamérica, Norte de Europa y el Reino Unido. Se estima que 1.4 millones de personas en los EE.UU. y 2.2 millones de personas en Europa sufren esta enfermedad debilitante (Croxen *et al* 2013).

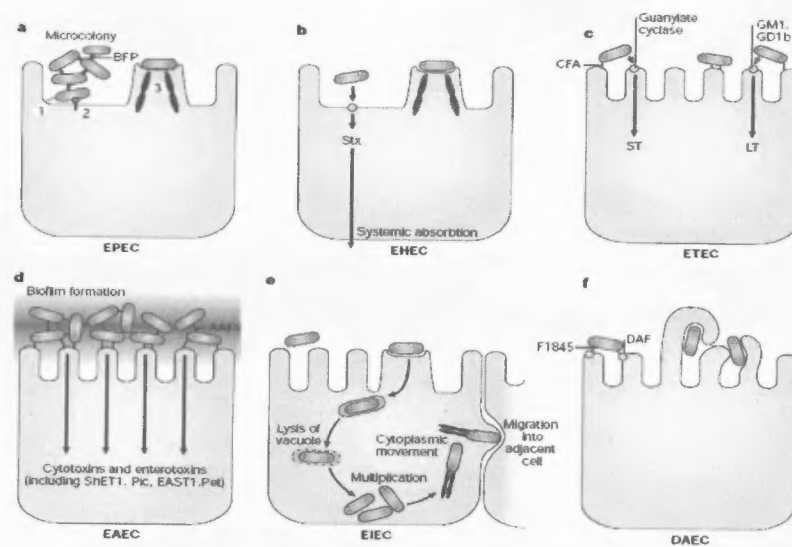


Figura 5. Esquemas de la patogenicidad de los patotipos intestinales de *E. coli* (Tomado de Kaper *et al.*, 2004).

Cuadro 2 Características de los Grupos de *E coli* causantes de diarrea

Grupo	Sintomas clínicos	Epidemiología	Serogrupos y serotipos mas comunes	Factores de patogenicidad
ETEC	Diarrea aguda acuosa	Ninos menores de dos años y diarrea del viajero	O8 H9 O15 H11 O20 H O25 H O27 H7 O78 H12 O148 H28 O159 H20	ST y LT CFA
EHEC	SUH CH diarrea sin sangre dolor abdominal fiebre vómito	Ninos y adultos que la adquieren por comer carne cruda o mal cocida	O157 H7 O26 H11 O103 H2 O113 H21 O119 O128 O145	STX A/E Intimina pO157
EIEC	Diarrea con moco y sangre o diarrea acuosa Tambien se presenta cuadro disentérico	Ninos menores de seis meses	O28 H O112ac H O144 H O152 H 164 H O167 H	Invasividad Plásmido de 140 MDa
EPEC	Diarrea aguda dolor abdominal vómito fiebre baja	Ninos menores de seis meses hasta dos años	O55 O86 O142 O111 H O127	A/E BFP Plásmido EAF de 50 70 MDa
EAEC	Diarrea liquida verde con moco sin sangre diarrea persistente hasta 20 dias	Recien nacidos y niños menores de dos años	O44 H18	Fimbria AAFI y II EASTI Proteinas Pet y Pic OMP Plásmido de 60 MDa Citotoxina
DAEC	Diarrea acuosa sin sangre	Ninos de 1 a 5 años	O126 H27	Fimbria F1845 OMP

LT= toxina termolabil
 ST= toxina termo estable
 CFA= factor de colonización antigénico
 BFP= pili con forma rizada

EAF=factor de adherencia de EPEC
 OMP=proteína de membrana
 STX=toxina shiga
 EAST=toxina ST de cepas enteroagregativas

Tomado de Rodriguez Ángelez 2002

1.7 Genoma

Las especies de *E. coli* incluyen cepas patógenas y no patógenas encontradas en el tracto intestinal de reptiles y animales de sangre caliente. Sobre las pasadas décadas este microorganismo ha servido como modelo para el estudio de muchos de los procesos fundamentales de la biología molecular, química y evolución. Varias secuencias genómicas de *E. coli* han sido publicadas y almacenadas en bases de datos públicas (<http://www.genomesonline.org/>) revelando la increíble diversidad de esta especie (Blattner *et al.* 1997, Perna *et al.* 2001, Ishii y Sadowsky 2008, Lukjancenko *et al.* 2010).

El genoma típico de *E. coli* está entre 4.5 y 5.5 millones de pares de bases (Mbp) de largo codificando aproximadamente 4500 a 5500 genes (Blattner *et al.* 1997, Perna *et al.* 2001, Rasko *et al.* 2008, Touchon *et al.* 2009). El genoma de *E. coli* sencillo y de ADN circular tiene un peso molecular de aproximadamente 4×10^9 y una longitud total de 1.4 mm (Kleppe *et al.* 1979). En Bettelheim 1992). Desde que este ADN está empacado en una célula de aproximadamente 2 μm de longitud, la concentración del mismo en una célula típica en crecimiento es aproximadamente 17 mg/ml. El ADN empacado en una célula de *E. coli* es supercoloidal (Sinden *et al.* 1980). En Bettelheim 1992).

La longitud promedio de un gen es casi 1 kb y aproximadamente el 85% de su cromosoma está ocupado por secuencias codificadoras. Por lo tanto, la diferencia entre las cepas de *E. coli* con los cromosomas más pequeños y los más grandes podría involucrar más de 800 genes (Bergthorsson y Ochman 1998).

Existen tres fuentes generales que podrían contribuir a la diferencia en la longitud de los cromosomas: 1) duplicaciones y deleciones, 2) la adquisición de ADN foráneo incluyendo la integración de plásmidos y fagos, y 3) la acumulación de ADN repetitivo tales como la inserción de secuencias y

transposones (Bergthorsson y Ochman 1998) La transferencia horizontal es probablemente la mayor fuente de variación en la longitud del cromosoma entre cepas naturales. Se ha sugerido que al menos 17.6% de los genes (755 kb) de *E. coli* provienen de fuentes foráneas relativamente recientes con una tasa de transferencia horizontal de aproximadamente 16 kb cada millón de años desde su divergencia (Lawrence y Ochman 1998). Aislados naturales muestran un amplio rango de variación en la longitud del cromosoma; algunas cepas difieren más de 1 Mb. Esto sugiere que el contenido genético es altamente variable dentro de esta especie con cepas divergentes que han adquirido o perdido conjunto de genes (Ochman y Jones 2000).

La cepa de *E. coli* K-12 ha sido muy estudiada y el genoma de una de sus variantes, la cepa MG1655, fue secuenciada (Blattner *et al.* 1997). Esta cepa contiene 4 639 221 pares de bases de ADN circular de doble cadena. El 87.8% de este genoma codifica para proteínas, el 0.8% codifica para ARNs y 0.7% consiste en ADN repetido sin función conocida. Se estima que alrededor del 11% del cromosoma tiene funciones de regulación. Un 38% de los 4 288 ORFs (marcos de lectura abierta) no tienen función conocida. El contenido promedio de GC es del 50.8%. Entre estos genes con contenido GC diferentes destacan las llamadas islas de patogenicidad (regiones donde se encuentran los genes que confieren capacidades patógenas a una bacteria) (Johnson y O'bryan 2000).

La cepa STEC O157:H7 ha sufrido numerosos eventos de transferencia horizontal desde que se separó de la cepa K-12 hace aproximadamente 4.5 millones de años y tiene 1 387 genes diferentes, los cuales incluyen factores de virulencia, diferentes rutas metabólicas, profagos, transposones y otras nuevas funciones (Perna *et al.* 2001).

1 7 1 Plasmidos

Existe informacion genetica adicional en forma de elementos extracromosomales o plasmidos. Son secuencias adicionales de ADN que estan separadas del cromosoma. Los plasmidos al igual que el cromosoma poseen doble cadena de ADN superenrollado pero sin proteinas asociadas. Tienen replicacion independiente del cromosoma bacteriano. Estos son el componente mas dinamico del genoma bacteriano ya que son facilmente moviles entre cepas. Su peso molecular oscila de 2×10^6 a 10^8 daltones variando desde 1 hasta 1 000 Kb y con frecuencia se les aisla en forma de un circulo cerrado y en menor proporcion en forma lineal. En la mayoria de los casos se considera que no son moleculas esenciales para la existencia de la bacteria sin embargo poseen informacion genetica importante para ellas. Los plasmidos juegan un papel importante en la evolucion bacteriana incrementando la diversidad genetica por la adquisicion, remocion y transferencia horizontal de genes entre bacterias y contribuyen grandemente en la adaptacion a nuevos y cambiantes nichos ecologicos (Gyles y Boerlin 2014).

Los plasmidos son comunes en *E. coli* aunque esta bacteria puede sobrevivir sin ningun plasmido o por el contrario presentar un buen porcentaje del genoma en estos elementos (Souza *et al.* 2001). Aproximadamente 300 clases de plasmidos han sido descritos en esta especie. Aislados naturales de *E. coli* generalmente poseen entre uno a cinco plasmidos pequenos y entre uno a dos plasmidos grandes. Los plasmidos pequenos son de menos de 7.5 kb y los grandes estan entre un rango de 40 a 200 kb. Entre los plasmidos grandes estan los F (factores sexuales) y los R (resistencia a drogas) los cuales son de aproximadamente 100 kb. Un solo plasmido puede conferir resistencia a multiples antibioticos (Sanchez *et al.* 2012). Entre los plasmidos pequenos estan los Col E1 (produccion de colicinas) de aproximadamente 6 kb.

En los plasmidos se puede encontrar informacion para la asimilacion de azucars raros e hidrocarburos para la produccion de colicinas (sustancias que eliminan a posibles competidores de la misma especie) resistencia a antibioticos y a metales pesados simbiosis fijacion de nitrogeno inmunidad contra fagos y colicinas genes que codifican para intercambio genetico adhesinas y fimbrias relacionadas con la patogenesis y toxinas La movilizacion de plasmidos no esta bien comprendida desde el punto de vista molecular Sin embargo se conoce que existen plasmidos conjugativos o sexuales los cuales son capaces de transferirse por si mismos por medio de la conjugacion Estos plasmidos son grandes (al menos 25 kb) y contienen los genes necesarios para el reconocimiento bacteria-bacteria los genes del pili sexual y los genes que permiten la movilizacion del ADN Los plasmidos no conjugativos tambien pueden ser transferidos por medio de la conjugacion al ser acarreados por plasmidos conjugativos Estos ultimos se denominan plasmidos movilizables y pueden ser de diferentes tamanos Muchos plasmidos son capaces de transferirse a si mismos entre diferentes especies (modelo panmictico de distribucion de plasmidos) (Souza y Eguiarte 1997) Algunos de estos plasmidos son sumamente exitosos ya que ademas de ser promiscuos estan sobre-representados en las poblaciones bacterianas estos son los denominados plasmidos epidemicos y son los responsables de la adquisicion por transferencia horizontal de resistencia a antibioticos o factores de virulencia (Souza y Eguiarte 1997) Sin embargo no todos los plasmidos son de rango de hospedero amplio ya que existen plasmidos que solo se transfieren verticalmente con sus cromosomas hospederos generando una fuerte co-evolucion entre ambos genomas (plasmidos clonales) asi como plasmidos con transferencia limitada a genomas especificos dentro de una misma especie bacteriana

1 8 Metodos de genotipificacion microbiana

Los metodos de tipificacion se han clasificado tradicionalmente en fenotipicos (basados en características bioquímicas o fisiológicas de los microorganismos) y genotipicos o moleculares (basados en el estudio del ADN) (Fernandez *et al* 2013) Los metodos de tipificacion fenotipicos se usan cada vez con menos frecuencia en la investigacion por los problemas de baja reproducibilidad y poder de discriminacion que tienen a nivel intraespecie (Scott *et al* 2002 Fernandez *et al* 2013) Sin embargo algunas tecnicas fenotipicas como el perfil de resistencia antimicrobiano y metodos inmunologicos pueden ser utiles en algunas situaciones

Los metodos genotipicos deben cumplir tres criterios *tipeabilidad* que es la capacidad de obtener un resultado positivo para cada aislamiento analizado *poder de discriminacion* que es la capacidad de diferenciar aislamientos no relacionados y *reproducibilidad* que es la capacidad de brindar el mismo resultado al repetir el ensayo (Olive y Bean 1999) El interes de estas tecnicas radica en su capacidad para establecer la relacion genetica (clonalidad) que existe entre aislados implicados en un brote ademas de ser herramientas utiles para confirmar la fuente de infeccion o reservorio (Olive y Bean 1999 Scott *et al* 2002 Fernandez *et al* 2013) Pueden utilizar como diana tanto ADN cromosomico como ADN de elementos geneticos moviles de transmision horizontal (plasmidos transposones integrones y secuencias de insercion) Se pueden clasificar en tres grandes grupos de tecnicas a) las basadas en el estudio de los perfiles de restriccion del ADN (plasmidico o cromosomico) b) las que se fundamentan en la amplificacion de secuencias de ADN mediante PCR y c) las basadas en la secuenciacion parcial de genes

1 8 1 Metodos basados en la restriccion del ADN

Estudio de los perfiles de ADN plasmidico El estudio de los perfiles de plasmidos es una tecnica relativamente sencilla de realizar y de interpretar

Se requiere una extracción de los plásmidos generalmente mediante una lisis celular que posteriormente son separados mediante electroforesis en gel de agarosa. Se considera el número de bandas de ADN plasmídico y sus respectivos tamaños. Esta metodología se limita al estudio de brotes pequeños y siempre de forma complementaria a otras técnicas basadas en el estudio de ADN cromosómico (Fernandez *et al* 2013). Su bajo poder de discriminación se ha relacionado con problemas metodológicos como puede ocurrir con la extracción de algunos plásmidos de gran tamaño que resultan difíciles de separar mediante electroforesis convencional y de interpretación de resultados. Una alternativa para aumentar su poder de discriminación consiste en digerir los extractos plasmídicos con varias enzimas de restricción (perfil de restricción plasmídica).

Los perfiles de plásmidos aunque suelen ser sencillos pueden estar sujetos a cierta variabilidad que complica su interpretación. Los plásmidos pueden presentar diferentes conformaciones dependiendo del grado de superenrollamiento. Por esta razón un mismo plásmido puede presentar diferentes patrones de movilidad electroforética que nos pueden hacer pensar que se tratan o que corresponden a plásmidos diferentes. Otra consideración importante es que plásmidos con diferente secuencia de ADN pueden presentar el mismo perfil de movilidad electroforética ya que pueden tener tamaños muy similares que no se diferencian en electroforesis convencional.

Estudio de los perfiles de ADN cromosómico Esta metodología se basa en la digestión del ADN cromosómico con una enzima de restricción generando un número variable de fragmentos de diferentes tamaños que se separan en geles de agarosa mediante PCR convencional (RFLP) o electororesis en campo pulsado (PFGE). La diferencia fundamental es el número de fragmentos que genera cada tipo de restricción: enzimas de corte frecuente (RFLP) o poco frecuente (PFGE) (Fernandez *et al* 2013).

Polimorfismos de Fragmentos Largos de Restriccion (RFLP) en esta tecnica los productos de la digestion (0.5 y 25 kb) pueden visualizarse con bromuro de etidio o mediante la hibridacion con sonda (marcaje quimico o radioactivo) de una determinada secuencia de la que hay varias copias en el cromosoma lo que incrementa la capacidad de discriminacion y de interpretacion de la tecnica El Ribotipado es una variante del RFLP donde los genes del ARNr altamente conservados son identificados utilizando sondas de oligonucleotidos despues del tratamiento del ADN genomico con endonucleasas de restriccion (Scott *et al* 2002) Los perfiles obtenidos (ribotipos o ribogrupos) se diferencian por el numero y la localizacion de estos genes Es una tecnica costosa larga y tediosa que involucra cultivo bacteriologico e identificacion extraccion de ADN electroforesis en gel Southern blotting y discriminacion de los patrones de ADN (Fernandez *et al* 2013)

Electroforesis en Gel de Campos Pulsantes (PFGE) es considerado el metodo estandar de tipificacion molecular bacteriana (Olive y Bean 1999) Es un metodo donde los patrones de bandas de ADN son generados despues del tratamiento del ADN bacteriano con endonucleasas de restriccion Los fragmentos grandes de ADN (10-800 Kb) producidos como resultado de la digestion de la enzima de restriccion son separados sobre un gel de agarosa generando un patron por el constante cambio de la direccion del campo electrico a intervalos predeterminados Los perfiles de ADN (pulsotipos) presentan entre 10 y 30 fragmentos de ADN con un tamaño variable que oscila entre 10 y 800 Kb Esta tecnica es altamente reproducible y facil de interpretar Varios estudios han demostrado que el PFGE tiene un poder discriminatorio muy alto comparado a otros metodos de tipificacion tales como MLST y RAPD Sin embargo el PFGE es un metodo laborioso consume tiempo y requiere de equipo y entrenamiento especializado Tambien al inicio su costo es elevado (Olive y Bean 1999)

1 8 2 Metodos basados en la amplificacion de acidos nucleicos

Estas tecnicas analizan una pequeña porcion del cromosoma. La amplificacion se realiza mediante PCR utilizando como dianas genes o secuencias de ADN polimorficas que se encuentran distribuidas por el cromosoma (Fernandez *et al* 2013). En comparacion con la PFGE, los metodos de PCR son menos laboriosos, flexibles (se puede trabajar un elevado numero de muestras y con diferentes tipos de formatos de PCR), mas rapidos en la obtencion de resultados (entre 24 y 48 horas) y mas sencillos para interpretar los resultados debido a que los perfiles obtenidos suelen ser menos complejos que los obtenidos mediante PFGE. Su poder de discriminacion es razonablemente elevado, aunque puede ser similar o inferior al de la PFGE, dependiendo del microorganismo y de la tecnica de PCR utilizada. Entre las limitaciones tecnicas mas importantes estan la inhibicion de la reaccion de amplificacion y la contaminacion de las muestras.

Amplificacion al Azar de ADN Polimorfico (RAPD) se caracteriza por utilizar un unico cebador de unos 10 nucleotidos que hibrida aleatoriamente en condiciones de baja temperatura (entre 36 y 45 °C) con regiones inespecificas del cromosoma. Este metodo de tipificacion es rapido, poco laborioso y permite realizar un analisis sencillo de los perfiles de bandas. El problema o inconveniente mas importante que puede encontrarse con la AP-PCR es su baja reproducibilidad, que limita su utilidad para el estudio de brotes (Fernandez *et al* 2013).

Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP)
Esta tecnica no suele utilizarse en estudios de pequeños brotes, sino en estudios epidemiologicos globales a largo plazo, en los que interesa conocer la estructura poblacional. Es una tecnica cara y compleja desde el punto de vista tecnico. En cuanto al poder de discriminacion del AFLP, este

puede ser similar o superior al de la PFGE dependiendo del microorganismo

Rep-PCR Los genomas microbianos contienen una variedad de secuencias de ADN repetitivas representando hasta un 5% del genoma (Ussery *et al* 2004 En Ishii y Sadowsky 2009) Muchos de estos elementos de ADN repetitivos son de función desconocida y han sido localizados en regiones intergenicas y extragenicas del genoma microbiano. Datos recientes sugieren que algunos de estos elementos repetitivos pueden estar involucrados en la síntesis o catabolismo del ARN y ADN (Ishii y Sadowsky 2009). Esta técnica se fundamenta en la utilización de cebadores que hibridan de forma específica con unas secuencias de ADN repetitivas que se encuentran dispersas por todo el genoma de bacterias, hongos y parásitos. Cuatro familias de secuencias repetitivas conservadas se han identificado: REP (*repetitive extragenic palindromic*), ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*), el elemento BOX y poltrinucleótidos cortos tales como (GTG)₅ (Mohapatra *et al* 2007, Ishii y Sadowsky 2009, Fernandez *et al* 2013). La variabilidad en los perfiles de bandas de ADN generados mediante REP-PCR viene determinada por el número de secuencias repetitivas y por la distancia que hay entre dichas secuencias (se amplifica la región de ADN que separa las secuencias REP). La técnica de REP-PCR es muy sencilla, rápida (menos de 2 días), reproducible (generalmente más que la AP-PCR pero menos que la PFGE) y económica.

El uso de elementos repetitivos para el análisis de genomas bacterianos ha proporcionado una poderosa herramienta para estudios de ecología microbiana, microbiología ambiental, diagnósticos moleculares, microbiología médica y análisis epidemiológicos (Ishii y Sadowsky 2009).

1 8 3 Metodos basados en la secuenciacion de ADN

Tipificacion de las secuencias multilocus (MLST) Esta tecnica se fundamenta en la secuenciacion parcial de 6 o 7 genes metabolicos muy conservados (*housekeeping genes*) que estan sujetos a escasa presion selectiva como ocurre con algunos genes relacionados con el metabolismo o con factores de virulencia y los genes ribosomales (Fernandez *et al* 2013) Es una tecnica muy laboriosa costosa y con un poder discriminativo bajo Se aplica principalmente en estudios epidemiologicos globales o a largo plazo en los que se quiere conocer la estructura poblacional

1 9 Enterobacterial repetitive intergenic consensos (ERIC-PCR)

Las secuencias ERIC fueron descritas por primera vez en *E coli* *Salmonella enterica serovar Typhimurium* y otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Hulton *et al* 1991) Son secuencias palindromicas de una longitud de 127 pb altamente conservadas a nivel de nucleotido que se encuentran en las regiones intergenicas y aparentemente solo dentro de las secuencias transcritas del genoma (Figura 4) (Wilson y Sharp 2006) El numero de copias de la secuencia ERIC varia entre diferentes especies se estimo por extrapolacion que puede haber aproximadamente 30 copias en *E coli* K-12 y quizas 150 en *S enterica* Typhimurium LT2 (Hulton *et al* 1991)

La tecnica de PCR usa estas secuencias de elementos repetitivos como cebadores de consenso y el ADN genómico total como modelo para amplificar secuencias de ADN localizadas entre elementos repetitivos sucesivos Seguido de la electroforesis la distribucion de estas secuencias genera un unico patron de tipificacion de ADN genómico para cada cepa o aislado (Ishii y Sadowsky 2009)

Esta tecnica de tipificacion genomica es un metodo sencillo y rapido que tiene el poder de resolucion para la identificacion microbiana a nivel de cepa o

subespecie (Ishii y Sadowsky 2009) Además es una técnica de bajo costo fácil de desarrollar y puede ser aplicada a pequeños o grandes números de aislados (Olive y Bean 1999) Los patrones de bandas suelen ser sencillos La secuencia ha sido utilizada como marcador genético para caracterizar aislados dentro de una especie bacteriana (Versalovic *et al* 1991) Para muchos organismos esta posee una habilidad discriminatoria más alta que otras técnicas de tipificación incrementando de este modo su uso Sin embargo algunos autores han cuestionado la reproducibilidad del ERIC-PCR en sus experimentos (Johnson y Obryan 2000 Meacham *et al* 2003) y otros han reportado bajo poder para discriminar entre aislados de *E. coli* de diferentes fuentes (Leung *et al* 2004 Mohapatra *et al* 2007 Mohapatra y Mazumder 2008)



Figura 6 Secuencia ERIC Es una secuencia de 127 pb que es mostrada como una horquilla Las líneas conectan bases en los dos brazos complementarios en ADN (y en ARN) (Tomado de Wilson y Sharp 2006)

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

- Caracterizar la diversidad genética de cepas de *E coli* por la técnica molecular ERIC PCR
- Determinar la presencia de plásmidos en estas cepas de *E coli* por extracción de ácidos nucleicos

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obtener el perfil genético de cepas de *E coli* aisladas de muestras humanas animales y aguas de tres comunidades de Panama mediante la amplificación de la secuencia ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*)
- Analizar los resultados de la amplificación para determinar la relación entre las diferentes fuentes y comunidades
- Analizar los resultados del perfil plasmídico de las cepas de *E coli* para determinar la prevalencia entre las diferentes fuentes y comunidades

MATERIALES Y MÉTODOS

3 1 Aislamientos bacterianos de *E coli*

Para el estudio de la determinacion de plasmidos se utilizo 112 cepas de *E coli* y para la caracterizacion molecular por ERIC PCR se utilizaron 117 cepas de *E coli*. Las muestras fueron colectadas previamente por estudiantes de pregrado Yee y Batista (2010) quienes confirmaron los aislados por medio del API 20E (bioMerieux Marcy- l'Etoile-Francia) y las mismas reposan en la coleccion de cepas del Laboratorio de Microbiologia Experimental y Aplicada_ LAMEXA Vicerrectoria de Investigacion y Post-Grado (VIP) Universidad de Panama. Estas cepas de *E coli* fueron aisladas de muestras de heces de humanos y animales de granja (vacas, cerdos y gallinas) y de muestras de aguas.

Las muestras de heces humanas fueron colectadas de personas residentes en areas aledañas y las muestras de aguas de fuentes cercanas a las areas muestreadas. Las muestras fueron colectadas en tres localidades en el corregimiento de El Arado, distrito de La Chorrera, Provincia de Panama Oeste; en el corregimiento de Escobal, distrito de Colon, Provincia de Colon; y en La Ciudad del Niño, distrito de La Chorrera, Provincia de Panama Oeste.

3 2 Extraccion de ADN cromosomico con el kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison-USA)

Para la extraccion de ADN con el kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison-EEUU) se siguieron las instrucciones del fabricante que se detallan a continuacion. Se añadio 1 mL de un cultivo de *E coli* de 24 horas (hr) a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL. Luego se centrifugo entre 13 000 a 16 000 x g por 2 minutos (min) para colectar las celulas y seguido se removio el sobrenadante. Despues se añadio 600 µL de la Solucion de Lisis y suavemente se pipeteo hasta que las celulas fueron resuspendidas. Se incubo a 80°C por 5 min para lisar las celulas y se enfrio a temperatura ambiente (TA). Se añadio 200 µL de la solucion de precipitacion de proteinas a las celulas lisadas. Se agito

vigorosamente en el vortex por 20 segundos (s) para mezclar la solución de precipitación de proteínas con las células lisadas. Se incubó la muestra en hielo por 5 min. Se centrifugó nuevamente entre 13 000 a 16 000 x g por 3 min. Luego se transfirió el sobrenadante con el ADN a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL esteril que contenía 600 µL de isopropanol (Fisher Scientific) a TA. Posteriormente se mezcló suavemente por inversión hasta que las hebras de ADN formaron una masa visible y se centrifugó entre 13 000 a 16 000 x g por 2 min. Se decantó el sobrenadante cuidadosamente y se drenó el tubo sobre un papel limpio y absorbente. Se añadió 600 µL de etanol al 70% (Fisher Scientific) a TA y se invirtió el tubo varias veces suavemente para lavar el ADN. Se centrifugó entre 13 000 a 16 000 x g por 2 min y cuidadosamente se decantó el etanol. Luego se drenó el tubo sobre un papel limpio y absorbente y se secó el *pellet* con aire seco por 10 a 15 min. Se añadió 100 µL de la Solución de Rehidratación del ADN al tubo y se incubó la solución toda la noche a TA. Por último se almacenó el ADN a – 20 °C.

3.3 Extracción de ADN cromosómico por el Método de Lisis Alcalina

Se añadió 1.5 mL de un cultivo de *E. coli* de 24 h a un tubo de microcentrifuga. Se colectó las células por centrifugación por 5 min a 4000 rpm. Luego se re-suspendió el *pellet* en 200 µL de la solución de lisis (40 mM Tris-acetato pH 7.8 (Promega, Sigma, Aldrich), 20 mM Acetato de Sodio (Sigma, Aldrich), 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich) y 1% de SDS (J. T. Baker)) y se mezcló en el vortex.

Se añadió 66 µL de NaCl 5M (J. T. Baker) para remover la mayoría de las proteínas y *debris* de las bacterias y se mezcló bien. Luego se centrifugó a 14000 rpm por 5 min a TA. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se añadió el mismo volumen de cloroformo e invirtió suavemente unas 5 veces hasta que una solución lechosa se formara. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 5 min. Se extrajo el sobrenadante y se precipitó con una cantidad

doble de isopropanol 100% congelado. Se agito suavemente y se centrifugo a 14000 rpm por 5 min. Despues se decanto el isopropanol y se lavo el *pellet* con 500 μ L de etanol 70%. Se elimino el etanol y se seco el *pellet* por 10 a 15 min a TA. Por ultimo se disolvio el *pellet* en aproximadamente 50 μ L de buffer TE o agua destilada esteril.

3.4 Extraccion de ADN plasmidico por el Metodo de Lisis Alcalina

Se coloco 1.5 mL de un cultivo de *E. coli* de 24 h en un microtubo. Se centrifugo a 5000 rpm por 5 min. Luego se decanto el sobrenadante. Se repitio este paso una vez mas. Seguido se resuspendio el *pellet* en 200 μ L de la Solucion de lisis I (50 mM de glucosa (Sigma-Aldrich), 10 mM de EDTA (Sigma Aldrich) y 25 mM de TrisHCl (Promega Gamma)) utilizando vortex hasta que se disolviera totalmente.

Luego se le agrego 200-400 μ L de la Solucion de lisis II (NaOH 0.2N () y SDS (J T Baker)) preparada fresca. Se mezclo por inversion hasta que se quedo transparente y se incubo durante 5 min en hielo. Despues se agrego 300 μ L de la Solucion de lisis III (60 mL de 5M KAc (pH 4.8) (Sigma-Aldrich), 11.5 mL de AcH glacial (Merck) y 28.5 mL de agua) y se mezclo por inversion (se formo un moco blanco). Seguido se incubo durante 5 min en hielo y se centrifugo a 14000 rpm por 15 min. Posteriormente se retiro el sobrenadante (\cong 700 μ L) y se le agrego 1 volumen de isopropanol frio. Se agito y se incubo durante 10 min a TA. Se centrifugo a 14000 rpm por 20 min y se decanto el isopropanol. Se lavo con 500 μ L de etanol 70% frio y se invirtio sin agitar. Por ultimo se decanto con cuidado el etanol 70% y se seco el *pellet* a TA y se resuspendio en 50 μ L de buffer TE o agua libre de nucleasa.

3.5 Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC-PCR)

Las cepas fueron tipificadas por el método de PCR basado en secuencias de elemento repetitivo específicamente las secuencias ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*). Los cebadores utilizados fueron ERIC1R 5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3' y ERIC2 5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3' (Versalovic *et al* 1991).

La mezcla del PCR consistió de 12.5 µL de *Master Mix* (Roche Diagnostics GmbH Penzberg Alemania), 0.6 µL de cada uno de los cebadores (25 µM) (Invitrogen), 1.25 µL de Albumina Bovina (30 mg/mL) (Sigma-Aldrich) y 8.1 µL de agua libre de nucleasas. Después fue colocado 2 µL de la muestra de ADN directamente en 23 µL de la mezcla de PCR para un total de 25 µL de reacción. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización 94 °C por 1 min, alineamiento 55 °C por 1 min, extensión 72 °C durante 6 min y finalmente una extensión a 72 °C durante 10 min. Para la amplificación se utilizó un termociclador (Life Touch Bioer Technology CO LTD China). Fue utilizado un control negativo (agua destilada libre de nucleasas) en la amplificación de la PCR. Los productos de la amplificación fueron almacenados a -80 °C hasta su análisis.

La separación de los fragmentos de ADN amplificados fue lograda por una electroforesis utilizando un gel de agarosa al 0.7% (BD Difco) con un marcador de peso molecular de 500 pb (DNA Molecular Weight Marker XVII Roche Diagnostics GmbH Penzberg Alemania) corrida a 90 voltios por una hora y media. Los geles fueron teñidos con una solución de bromuro de etidio al 0.5 µg/mL (Sigma-Aldrich) y visualizados bajo luz UV y fotografiados con un fotodocumentador. Las posiciones de las bandas en cada una de las líneas y en cada gel fueron normalizadas utilizando el marcador de ADN de 500 pares de

bases (pb) como un estandar de referencia. Variaciones en la intensidad y forma de bandas entre los aislados no fueron consideradas una diferencia.

Los patrones de bandas de cada una de las cepas fueron analizados por el análisis estadístico UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic averages*) utilizando el Software SPSS version 19. Por medio de este análisis la similitud entre las cepas se visualizó por medio de dendrogramas contruidos a partir de una matriz binaria (1 presencia de bandas, 0 ausencia de bandas) calculada con el coeficiente de Jaccard. La prueba de Chi cuadrado (χ^2) y una tabla de contingencia fueron utilizadas para medir el grado de asociación entre las diferentes fuentes (animales, humano y agua) con respecto a la fuente de muestreo.

RESULTADOS

4 1 Determinacion de la presencia de plasmidos en cepas de *E coli*

En este estudio se analizo un total de 112 cepas de *E coli* provenientes de tres comunidades dos de la provincia de Panama Oeste (El Arado y Ciudad del Niño) y una de la provincia de Colon (Escobal) Para las tres comunidades se determino la presencia de plasmidos de acuerdo a la fuente de muestreo (Cuadros 3 4 y 5) (Figs 7 y 8) La cantidad de muestras vario para cada comunidad 25 muestras en El Arado 49 muestras en Ciudad del Niño y 38 muestras en Escobal

Los resultados mostraron que un 70 5 % (79 de 112) de las muestras analizadas presentaron plasmidos En la comunidad de El Arado se determino el 24 1 % (19 de 79) en Ciudad del Niño 44 3 % (35 de 79) y en Escobal 31 6 % (25 de 79) de muestras positivas (Fig 7) En los Cuadros 3 4 y 5 se muestran en detalle la cantidad de muestras positivas en cada comunidad segun la fuente de muestreo

Las muestras que presentaron los mayores porcentajes de prevalencia de plasmidos fueron las muestras de aguas en la comunidad de Escobal con un 32% (8 de 25) las muestras de heces de humanos en la comunidad de El Arado con un 31 6% (6 de 19) y las muestras de heces de gallina en la comunidad de Escobal con un 28% (7 de 25) (Cuadros 3 y 5) (Fig 8) Las muestras de heces de humanos y cerdos en la comunidad de Ciudad del Niño tambien presentaron porcentajes significativos de prevalencia de plasmidos (23%) (Cuadro 4) (Fig 8)

Cuadro 3 Numero de muestras positivas por plasmidos en la comunidad de El Arado de acuerdo a la fuente de muestreo

Fuente	N° ensayos	N° muestras positivas
Vaca	3	2
Cerdo	5	3
Gallina	6	5
Humano	6	6
Agua	5	3
Total	25	19

Cuadro 4 Numero de muestras positivas por plasmidos en la comunidad de Ciudad del Niño de acuerdo a la fuente de muestreo

Fuente	N° ensayos	N° muestras positivas
Vaca	9	7
Cerdo	10	8
Gallina	10	5
Humano	10	8
Agua	10	7
Total	49	35

Cuadro 5 Numero de muestras positivas por plasmidos en la comunidad de Escobal de acuerdo a la fuente de muestreo

Fuente	N° ensayos	N° muestras positivas
Vaca	9	4
Cerdo	3	2
Gallina	9	7
Humano	9	4
Agua	8	8
Total	38	25

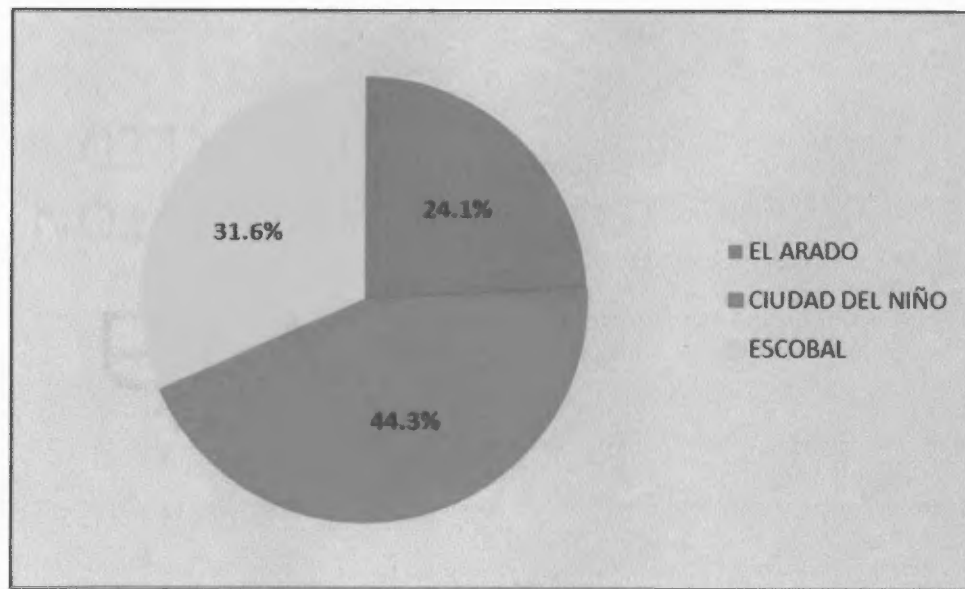


Figura 7. Prevalencia de plásmidos en cada una de las comunidades muestreadas

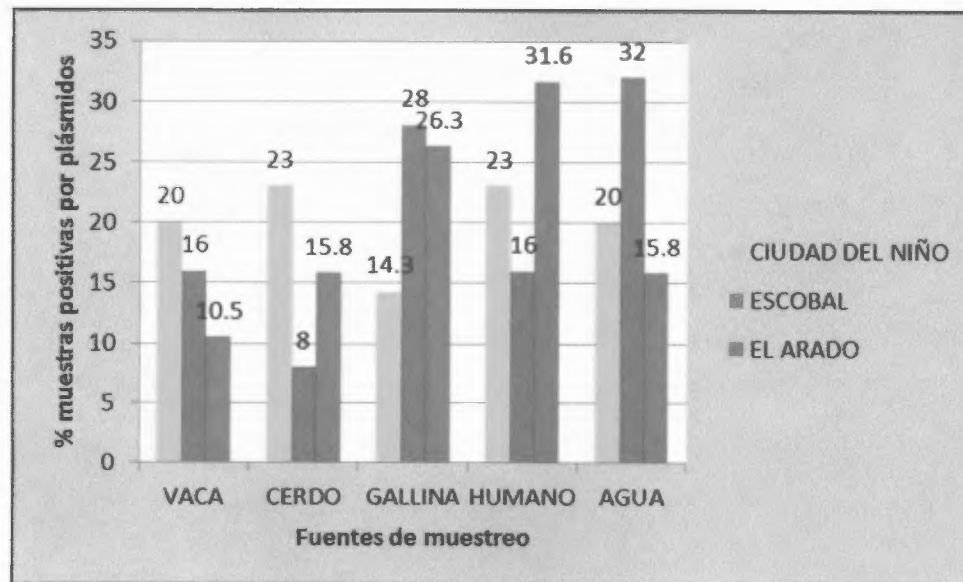


Figura 8. Prevalencia de plásmidos en las diferentes fuentes de muestreo y comunidades

4.2 Caracterización de la diversidad genética de cepas de *E. coli* por la técnica de ERIC-PCR

Uno de los objetivos del presente estudio fue determinar la relación genética de cepas de *E. coli* aisladas de muestras de aguas y de heces de humanos y animales de granja (vacas, cerdos y gallinas) del Corregimiento de El Arado, distrito de La Chorrera; Corregimiento de Escobal, distrito de Colon; y Ciudad del Niño, distrito de La Chorrera (Cuadro 7). La técnica de ERIC-PCR fue utilizada para analizar un total de 117 cepas de *E. coli* que produjeron bandas de ADN de diferentes tamaños.

Cuadro 6 Cepas de *E. coli* utilizadas en el ERIC-PCR

Sitio de muestreo	Fuente	Tipo de muestra	Designación	N.º de cepas
Ciudad del Niño	Vaca	heces	CiVA	9
	Gallina	heces	CiGA	10
	Cerdo	heces	CiCE	10
	Humano	heces	CiHu	10
	Agua	agua	CiAg	10
Escobal	Vaca	heces	EVA	9
	Gallina	heces	EGA	9
	Cerdo	heces	ECE	4
	Humano	heces	EHu	9
	Agua	agua	EAG	8
El Arado	Vaca	heces	AVA	5
	Gallina	heces	AGA	6
	Cerdo	heces	ACE	5
	Humano	heces	AHu	6
	Agua	agua	AAg	7
TOTAL				117

Los patrones de bandas del ERIC-PCR mostraron que las cepas de *E. coli* fueron genéticamente diversas con valores de similitud que estaban entre 48% a 100%. Las Figuras 9 a 13 muestran diferentes geles de agarosa del análisis ERIC PCR que incluyen bandas de ADN de cepas de *E. coli*.

El análisis electroforético de los productos del ERIC PCR generó diferentes patrones de bandas de ADN que estaban principalmente en un rango entre 245 a 4000 pares de base (bp).

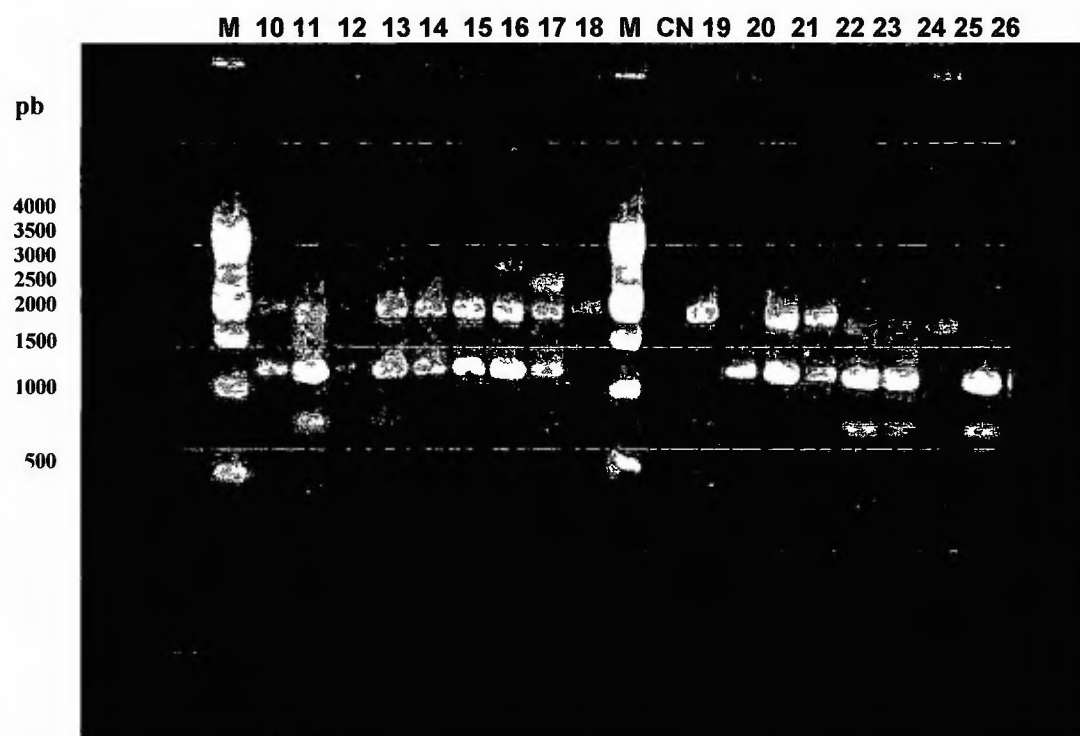


Figura 9 Electroforesis en gel de agarosa del ERIC PCR mostrando bandas de ADN de cepas de *E. coli*. Las líneas M son los marcadores de peso molecular de ADN de 500 pb (Roche Diagnostics GmbH Penzberg Alemania) la línea CN es el control negativo y las líneas del 10-26 son cepas de *E. coli* aisladas de aguas heces de humanos y animales.

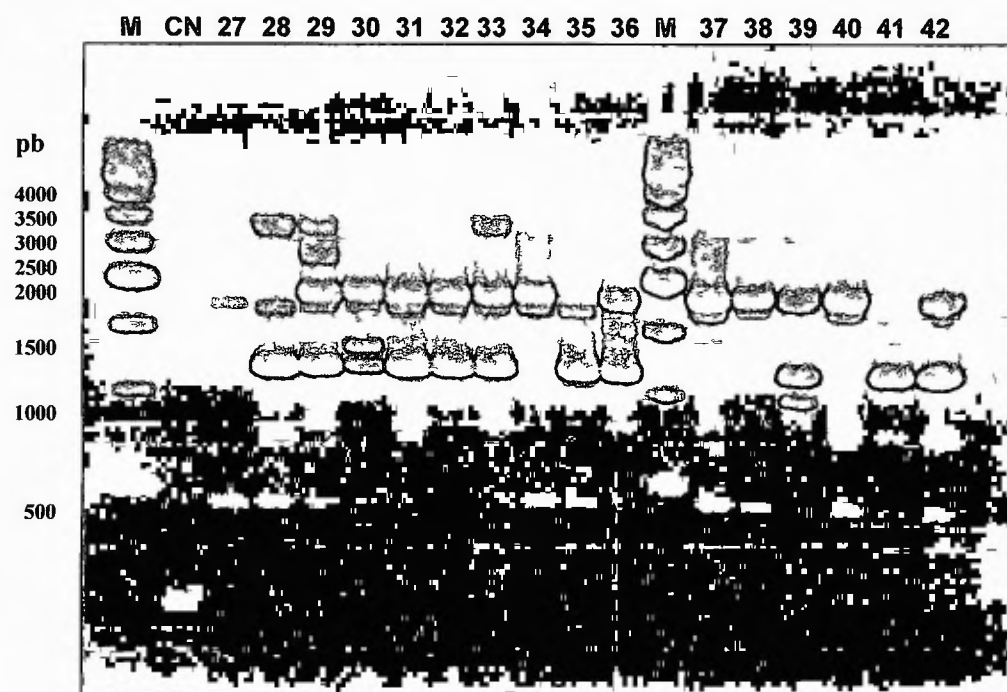


Figura 10 Electroforesis en gel de agarosa del ERIC PCR mostrando bandas de ADN de cepas de *E. coli*. Las líneas M son los marcadores de peso molecular de ADN de 500 pb (Roche Diagnostics GmbH Penzberg Alemania) la línea CN es el control negativo y las líneas del 27-42 son cepas de *E. coli* aisladas de aguas heces de humanos y animales

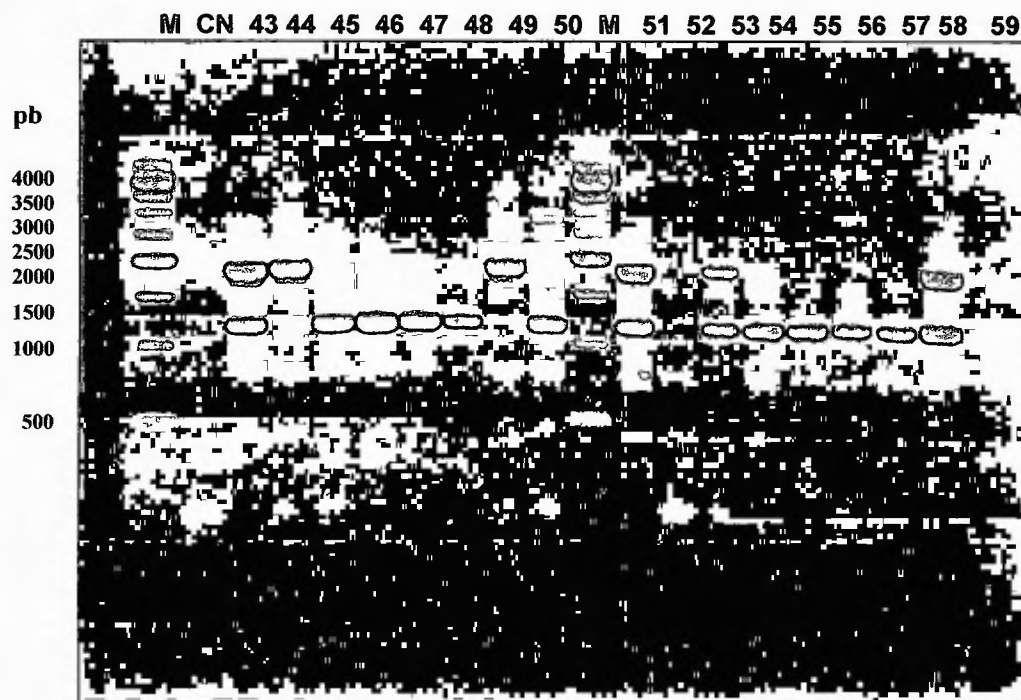


Figura 11 Electroforesis en gel de agarosa del ERIC PCR mostrando bandas de ADN de cepas de *E. coli*. Las líneas M son los marcadores de peso molecular de ADN de 500 pb (Roche Diagnostics GmbH Penzberg Alemania) la línea CN es el control negativo y las líneas del 43-59 son cepas de *E. coli* aisladas de aguas heces de humanos y animales

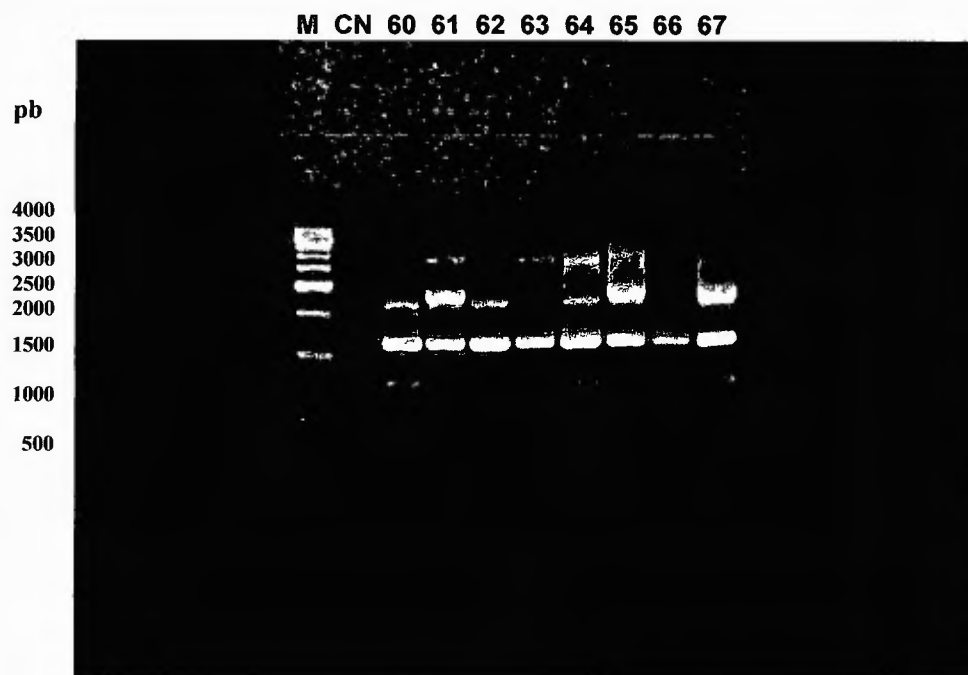


Figura 12 Electroforesis en gel de agarosa del ERIC PCR mostrando bandas de ADN de cepas de *E. coli*. La línea M es el marcador de peso molecular de ADN de 500 pb (Roche Diagnostics GmbH Penzberg Alemania) la línea CN es el control negativo y las líneas del 60-67 son cepas de *E. coli* aisladas de aguas, heces de humanos y animales.

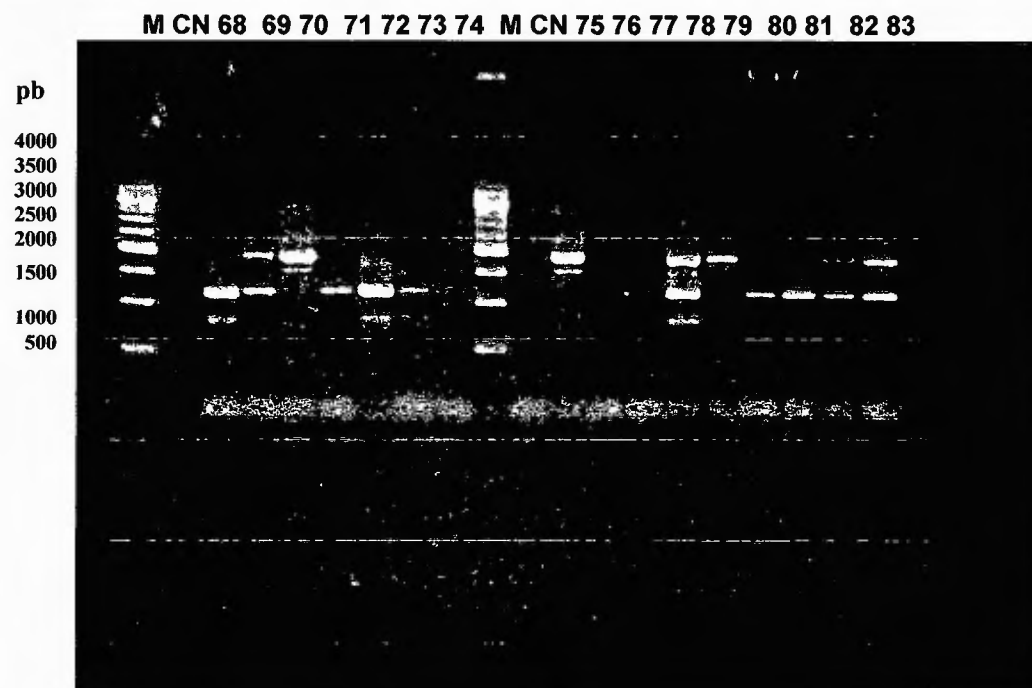


Figura 13 Electroforesis en gel de agarosa del ERIC PCR mostrando bandas de ADN de cepas de *E. coli*. Las líneas M son los marcadores de peso molecular de ADN de 500 pb (Roche Diagnostics GmbH Penzberg Alemania) las líneas CN son los controles negativos y las líneas del 68-83 son cepas de *E. coli* aisladas de aguas, heces de humanos y animales.

Las 117 cepas de *E coli* produjeron diferentes patrones de bandas que contenian entre 2 a 10 bandas La mayor diversidad de bandas de ADN se observo dentro del rango de 1850 a 770 bp El analisis estadistico a traves del programa UPGMA (*Unweighted Pair Group Method for Arithmetic Averages*) esta basado en una matriz binaria de bandas de ausencia o presencia y fue utilizado en este estudio para determinar las relaciones de similitud mutua entre todos los aislados

Se realizaron dendrogramas del analisis estadistico por cada sitio muestreado y tipo de fuente y un dendrograma mezclando de ambos factores utilizando el programa SPSS version 19 Los dendrogramas mostraron diferentes grupos que consistieron de dos o mas cepas de *E coli* Las cepas en el mismo grupo son mas homogeneas y geneticamente mas relacionadas Los grupos fueron definidos a un coeficiente de similitud (Coeficiente de Jaccard) de 0.87 Se utilizo la prueba de Chi-cuadrado (χ^2) y una tabla de contingencia para medir el grado de asociacion entre las diferentes fuentes (animales humano y agua) con respecto a la fuente de muestreo

4.2.1 Analisis de cepas de La Ciudad del Niño

El analisis de los resultados del estudio de la diversidad genetica entre las cepas de *E coli* aisladas de La Ciudad del Niño mostro una elevada diversidad entre las 23 cepas caracterizadas (Fig. 8) El ERIC PCR genero 39 patrones geneticos diferentes Cada *cluster* o grupo consistia de una o mas cepas de *E coli* Las cepas agrupadas por color (CiCE10 CiAg8 CiVA2 CiVA4 y CiGA7 CiVA1 y CiGA3 CiVA10 y CiGA2 CiVA5 y CiCE8 CiVA7 y CiHu8 CiCE2 y CiAg2 CiHu5 y CiAg1) mostraron patrones similares entre si por lo que se consideraron que pertenecian al mismo clon (Coeficiente de Jaccard ≥ 0.87) Las mismas representaron 35% del total de cepas evaluadas de esta comunidad

Se encontraron cepas posiblemente relacionadas con un Coeficiente de Jaccard entre 0.70 – 0.86 (CiCE6 CiGA5 CiVA8 CiGA9 CiHu2 CiCE4 CiHu3 CiAg9 CiAg4 CiAg7 CiHu1 CiAg3 CiCE1 CiGA10A CiHu7 CiCE3 y CiHu4). Las 15 cepas restantes de las 49 evaluadas presentaron un Coeficiente de Jaccard <0.70 por lo que se consideraron como cepas no relacionadas genéticamente (Fig. 10 y Cuadro 7).

En el dendrograma se observó que no hubo correlación entre la fuente o grupo (animal humano o agua) y la similitud genética de las cepas. En la Fig. 10 se observaron 7 agrupaciones que estaban conformadas por cepas de diferentes fuentes.

Cuadro 7 Historial de Conglomeracion de datos de La Ciudad del Niño

Etapa	Conglomerado q e se comb a		Coefice tes	Etapa en la q e el conglomerado aparece por p mera vez		Proxima etapa
	Conglomerad o 1	Conglomerad o 2		Conglomerad o 1	Conglomerad o 2	
1	29	47	1 000	0	0	5
2	21	41	1 000	0	0	19
3	34	40	1 000	0	0	17
4	6	37	1 000	0	0	29
5	2	29	1 000	0	1	9
6	4	15	1 000	0	0	9
7	1	11	1 000	0	0	15
8	9	10	1 000	0	0	16
9	2	4	1 000	5	6	24
10	5	27	889	0	0	38
11	18	36	857	0	0	17
12	43	46	833	0	0	27
13	30	42	833	0	0	18
14	23	32	833	0	0	29
15	1	25	800	7	0	23
16	9	13	800	8	0	22
17	18	34	774	11	3	25
18	20	30	774	0	13	26
19	21	48	750	2	0	33
20	22	33	714	0	0	28
21	17	31	714	0	0	42
22	7	9	700	0	16	23
23	1	7	682	15	22	39
24	2	19	667	9	0	39
25	3	18	667	0	17	26
26	3	20	652	25	18	30
27	43	45	643	12	0	32
28	14	22	635	0	20	34
29	6	23	619	4	14	35
30	3	12	576	26	0	36
31	16	35	571	0	0	40
32	43	49	567	27	0	37
33	21	24	567	19	0	43
34	14	38	556	28	0	36
35	6	26	554	29	0	38
36	3	14	533	30	34	37
37	3	43	501	36	32	40
38	5	6	469	10	35	42
39	1	2	465	23	24	46
40	3	16	443	37	31	41
41	3	8	430	40	0	43
42	5	17	404	38	21	45
43	3	21	402	41	33	45
44	39	44	400	0	0	47
45	3	5	361	43	42	46
46	1	3	293	39	45	47
47	1	39	260	46	44	48
48	1	28	246	47	0	0

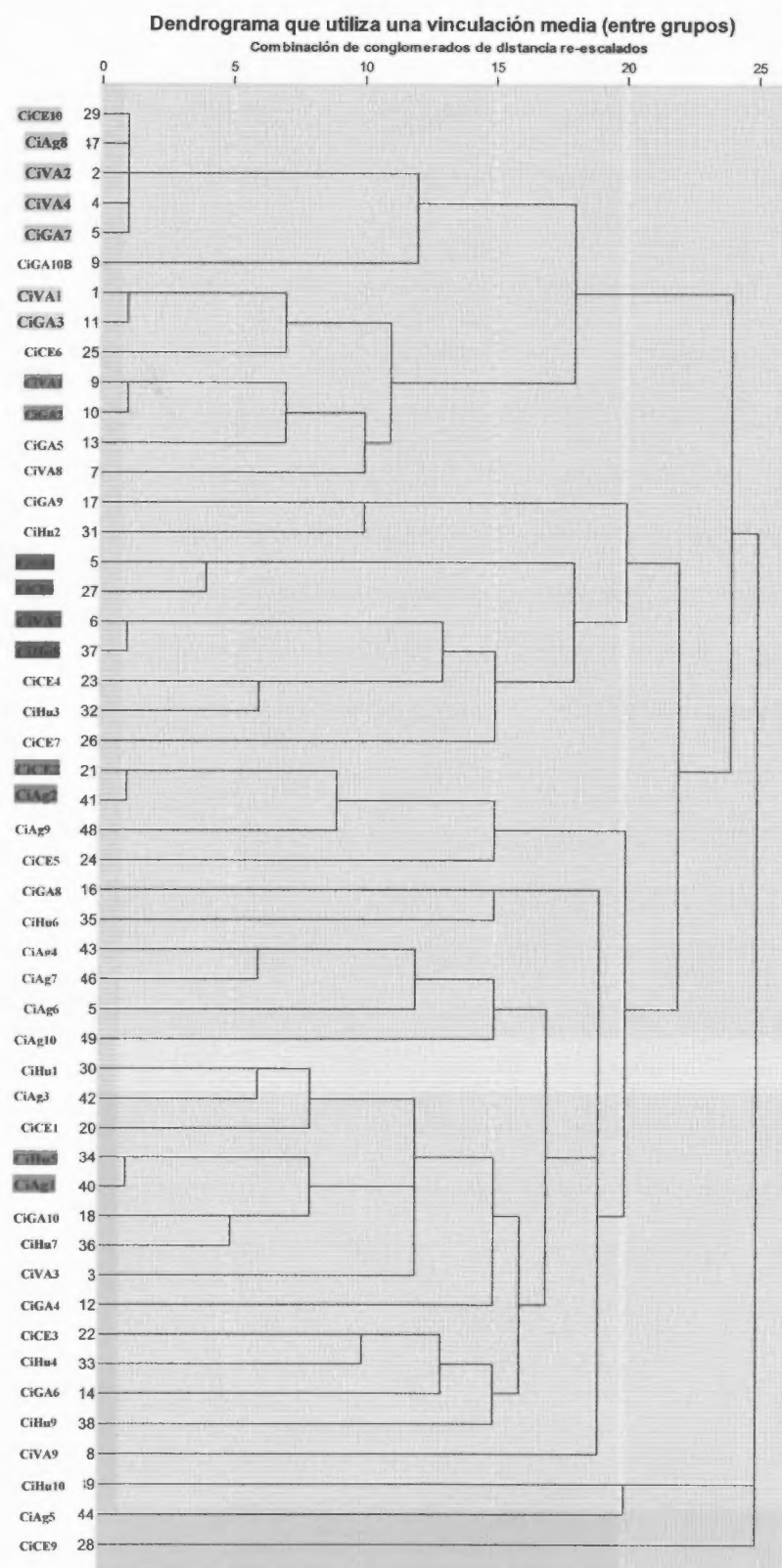


Figura 14. Dendrograma de cepas de Ciudad del Niño. Se muestra el parentesco de cepas de *E. coli* aisladas de aguas, humanos y animales de granja en Ciudad del Niño. Las cepas que mostraron similitudes de 90 a 100% pertenecían al mismo clon (cepas agrupadas por colores).

4 2 2 Analisis de cepas de Escobal

Las 39 cepas de *E. coli* de la comunidad de Escobal mostraron tambien gran diversidad genetica detectandose 29 patrones geneticos diferentes (Fig 11 Cuadro 8) Las cepas agrupadas por colores (EGA10 ECE9 EVA1 EGA2 EGA5 EHu5 EAG6 1A EGA4 EVA4 EGA9 EHu1 EAG7 1A EVA11 EHu7 EHu8) presentaron un Coeficiente de Jaccard ≥ 0.87 por lo que se consideraron cepas de un mismo clon representando un 38%

Las cepas EAG2 B EAG9 2B EGA6 EVA2 EHu2 EAG7 2A EAG9 1B EVA3 EVA8 EVA5 EGA1 EGA8 EHu9 EAG6 2B ECE8 EVA9 EHu10 se consideraron posiblemente relacionadas con un Coeficiente de Jaccard entre 0.70 – 0.86 Las 8 cepas restantes se consideraron que no estaban relacionadas geneticamente (Coeficiente de Jaccard < 0.70)

En el dendrograma se observo que no hubo correlacion entre la fuente o grupo (animal humano o agua) y la similitud genetica de las cepas De los 5 grupos solo uno se agrupo por tipo de fuente EHu7 y EHu8 (Humano) (Fig 11 Cuadro 8)

Cuadro 8 Historial de Conglomeracion de datos de Escobal

Etapa	Conglomerado que se combina		Coeficientes	Etapa en la que el conglomerado aparece por primera vez		Proxima etapa
	Conglomerado 1	Conglomerado 2		Conglomerado 1	Conglomerado 2	
1	34	39	1 000	0	0	2
2	1	34	1 000	0	1	6
3	4	33	1 000	0	0	18
4	28	30	1 000	0	0	6
5	20	29	1 000	0	0	17
6	1	28	1 000	2	4	9
7	10	23	1 000	0	0	10
8	15	16	1 000	0	0	25
9	1	13	1 000	6	0	30
10	9	10	1 000	0	7	28
11	5	27	857	0	0	21
12	2	11	857	0	0	22
13	19	26	833	0	0	20
14	24	25	833	0	0	22
15	3	7	833	0	0	23
16	22	38	800	0	0	24
17	20	32	800	5	0	21
18	4	17	800	3	0	27
19	8	18	750	0	0	28
20	19	31	733	13	0	29
21	5	20	722	11	17	23
22	2	24	722	12	14	26
23	3	5	683	15	21	26
24	22	37	675	16	0	27
25	15	35	667	8	0	34
26	2	3	610	22	23	29
27	4	22	598	18	24	31
28	8	9	583	19	10	31
29	2	19	568	26	20	33
30	1	21	500	9	0	32
31	4	8	480	27	28	33
32	1	14	476	30	0	35
33	2	4	432	29	31	35
34	12	15	383	0	25	36
35	1	2	304	32	33	36
36	1	12	269	35	34	38
37	6	36	250	0	0	38
38	1	6	201	36	37	0

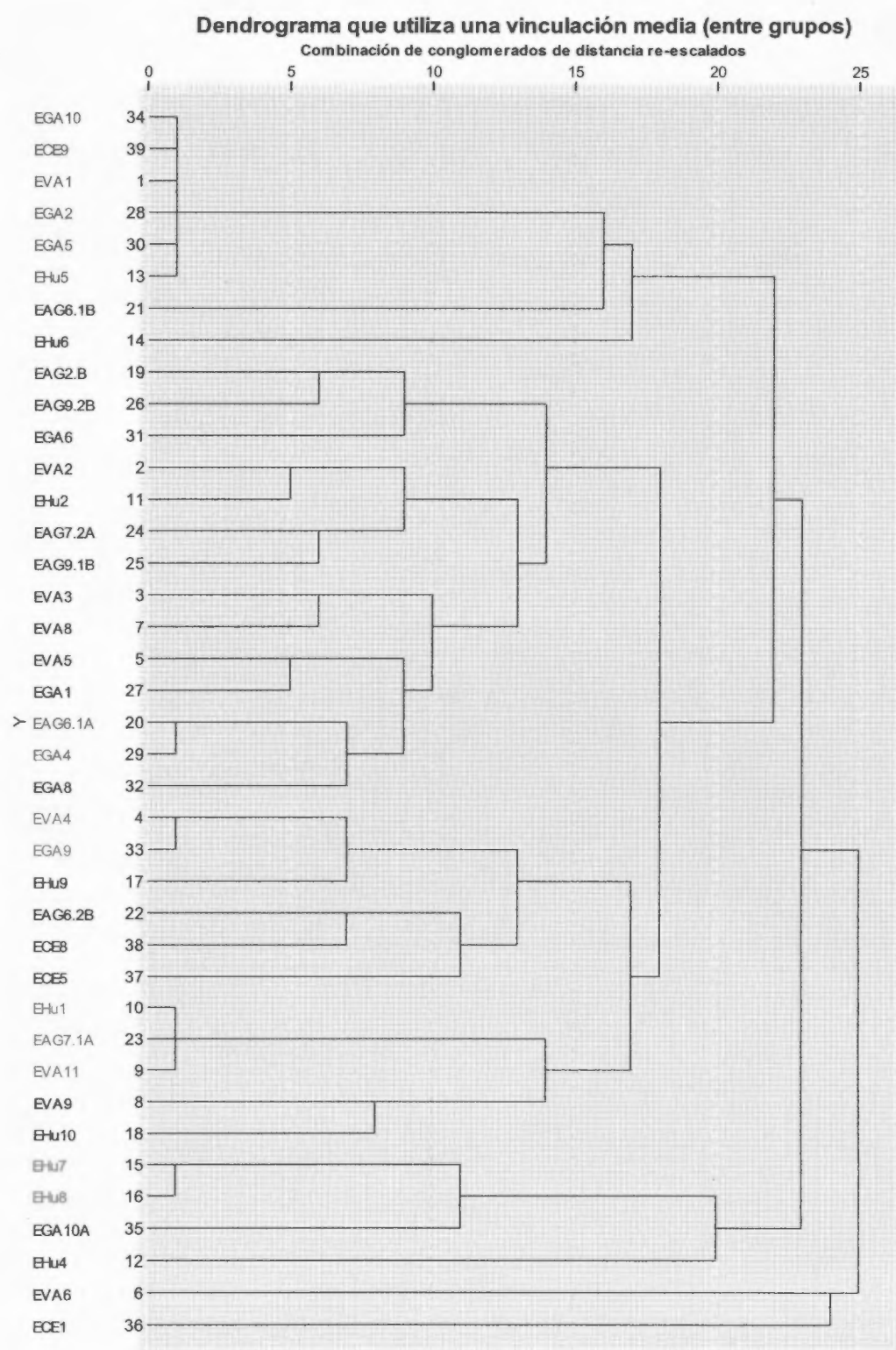


Figura 15. Dendrograma de cepas de **Escobal**. Dendrograma mostrando el parentesco de cepas de *E. coli* aisladas de aguas, humanos y animales de granja de Escobal.

4 2 3 Analisis de cepas de El Arado

Los resultados del estudio de la diversidad genética entre las 29 cepas aisladas de la comunidad de El Arado mostraron también una elevada diversidad genética detectándose 20 patrones genéticos diferentes por ERIC PCR (Fig 12 Cuadro 9) Las cepas de *E. coli* que mostraron patrones idénticos entre sí se consideraron que eran aislamientos del mismo clon (Coeficiente de Jaccard ≥ 0.87) AHu1A AHu3A AGA2 AGA12 AVA5 AGA10 AGA11 y ACE11 ACE7A ACE8 y ARG3A AAG6 y ARAG2 Estas representaron un 45% de las cepas evaluadas

Las cepas AVA11 y AHu2B ARVA6 y ARVA8 ARVA10 y AGA1 posiblemente estaban relacionadas ya que tenían un Coeficiente de Jaccard entre 0.7 a 0.86 El resto de las cepas analizadas (10 cepas) no mostraron un elevado grado de similitud (Coeficiente de Jaccard < 0.70) por lo que se consideraron no relacionadas

En el dendrograma se observó que no hubo correlación entre la fuente o grupo (animal humano o agua) y la similitud genética de las cepas El dendrograma mostró 4 agrupaciones que estaban formadas por diferentes fuentes a excepción de un grupo donde ambas cepas (AAG6 y ARAG2) pertenecían al grupo Agua (Fig 12 Cuadro 9)

Cuadro 9 Historial de Conglomeracion de datos de El Arado

Etapa	Conglomerado que se combina		Coeficientes	Etapa en la que el conglomerado aparece por primera vez		Proxima etapa
	Conglomerad o 1	Conglomerad o 2		Conglomerad o 1	Conglomerad o 2	
1	24	26	1 000	0	0	2
2	9	24	1 000	0	1	7
3	13	19	1 000	0	0	7
4	12	18	1 000	0	0	11
5	15	16	1 000	0	0	6
6	7	15	1 000	0	5	15
7	9	13	1 000	2	3	8
8	9	11	1 000	7	0	19
9	2	6	1 000	0	0	13
10	23	25	800	0	0	16
11	12	22	800	4	0	17
12	20	21	750	0	0	16
13	2	8	750	9	0	15
14	10	17	667	0	0	22
15	2	7	611	13	6	21
16	20	23	600	12	10	18
17	5	12	548	0	11	23
18	3	20	525	0	16	19
19	3	9	513	18	8	22
20	28	29	500	0	0	27
21	1	2	483	0	15	24
22	3	10	458	19	14	23
23	3	5	415	22	17	25
24	1	27	399	21	0	25
25	1	3	314	24	23	26
26	1	4	255	25	0	27
27	1	28	172	26	20	28
28	1	14	134	27	0	0

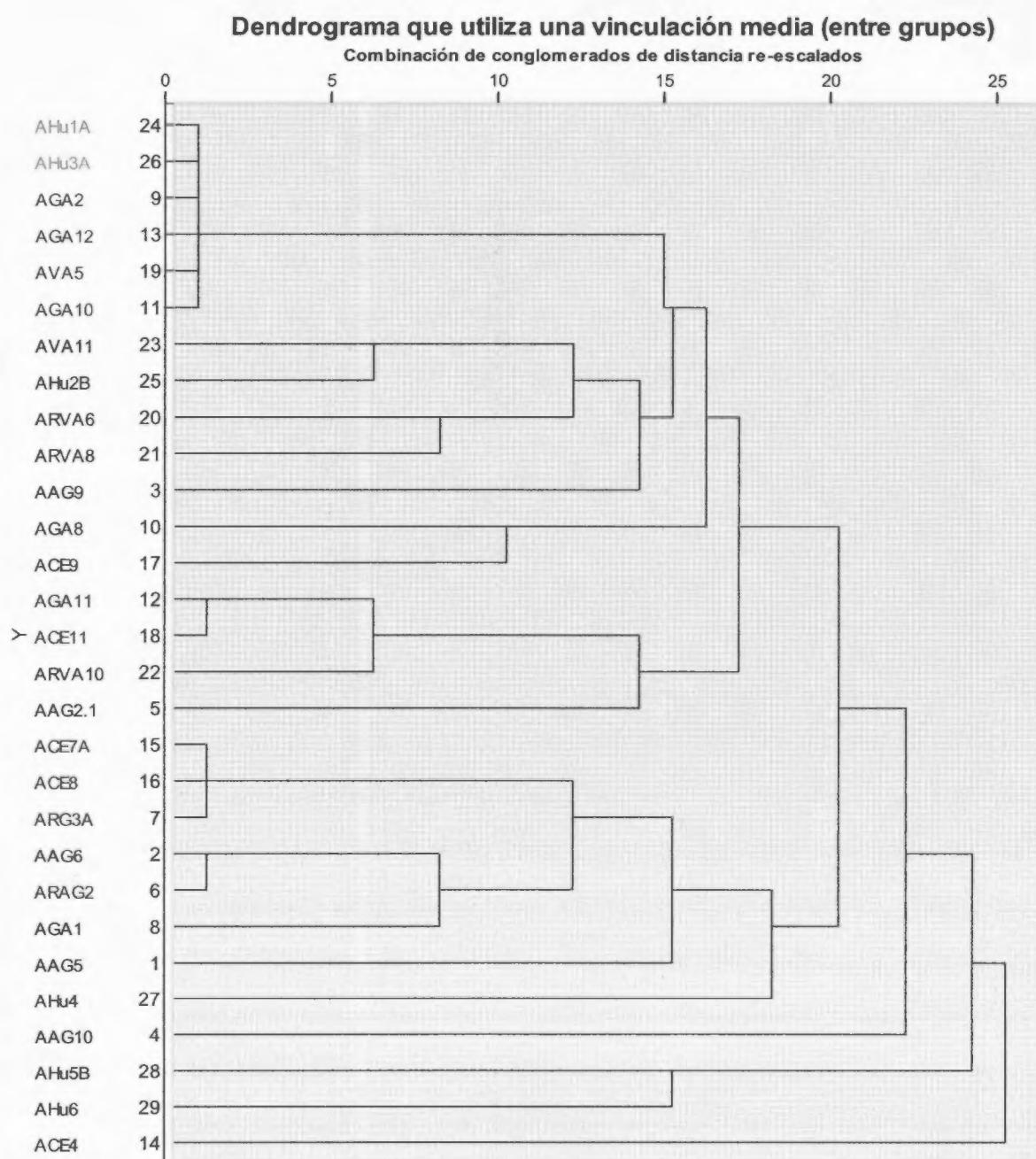


Figura 16. Dendrograma de cepas de **El Arado**. Dendrograma mostrando el parentesco de cepas de *E. coli* aisladas de aguas, humanos y animales de granja de El Arado.

4 2 4 Analisis del grupo de cepas de cerdo

Las 19 cepas de *E coli* aisladas del grupo Cerdo mostraron tambien una elevada diversidad genetica detectandose 17 patrones geneticos diferentes por ERIC-PCR (Fig 13 Cuadro 10) Las cepas agrupadas por colores (ACE7A y ACE8 CICE10 y ECE9) mostraron un Coeficiente de Jaccard ≥ 0.87 por lo que se consideraron cepas del mismo clon Estas cepas similares representaron 21% del total evaluadas y procedian de las tres comunidades estudiadas

Las cepas que pudieron estar relacionadas (Coeficiente de Jaccard entre 0.7 a 0.86) fueron CICE6 ECE8 ECE5 y ACE11 Las 11 cepas restantes se consideraron que no estaban relacionadas geneticamente ya que tenian un Coeficiente de Jaccard < 0.70 No hubo correlacion entre la fuente geografica de aislamiento (comunidad) y la similitud genetica de las cepas Por ejemplo el perfil genetico de la cepa CICE10 la cual proviene de la comunidad de Ciudad del Niño provincia de Panama Oeste es identico al perfil de la cepa ECE9 el cual pertenece a la comunidad de Escobal provincia de Colon Estas cepas estan en la misma agrupacion Sin embargo la cepa CICE2 y CICE5 las cuales fueron aisladas del mismo lugar (Ciudad del Niño) tuvieron perfiles geneticos muy diferentes con un porcentaje bajo de similitud (60%) Este mismo comportamiento se observa entre las cepas CICE4 CICE8 y CICE7

Cuadro 10 Historial de Conglomeracion de datos del grupo Cerdo

Etapa	Conglomerado que se combina		Coeficientes	Etapa en la que el conglomerado aparece por primera vez		Proxima etapa
	Conglomerad o 1	Conglomerad o 2		Conglomerad o 1	Conglomerad o 2	
1	16	17	1 000	0	0	10
2	10	14	1 000	0	0	6
3	6	13	800	0	0	8
4	12	19	750	0	0	6
5	2	5	600	0	0	11
6	10	12	583	2	4	13
7	1	3	571	0	0	11
8	6	18	550	3	0	10
9	4	8	500	0	0	12
10	6	16	467	8	1	14
11	1	2	458	7	5	13
12	4	7	432	9	0	18
13	1	10	425	11	6	15
14	6	11	403	10	0	16
15	1	9	346	13	0	17
16	6	15	283	14	0	17
17	1	6	227	15	16	18
18	1	4	160	17	12	0

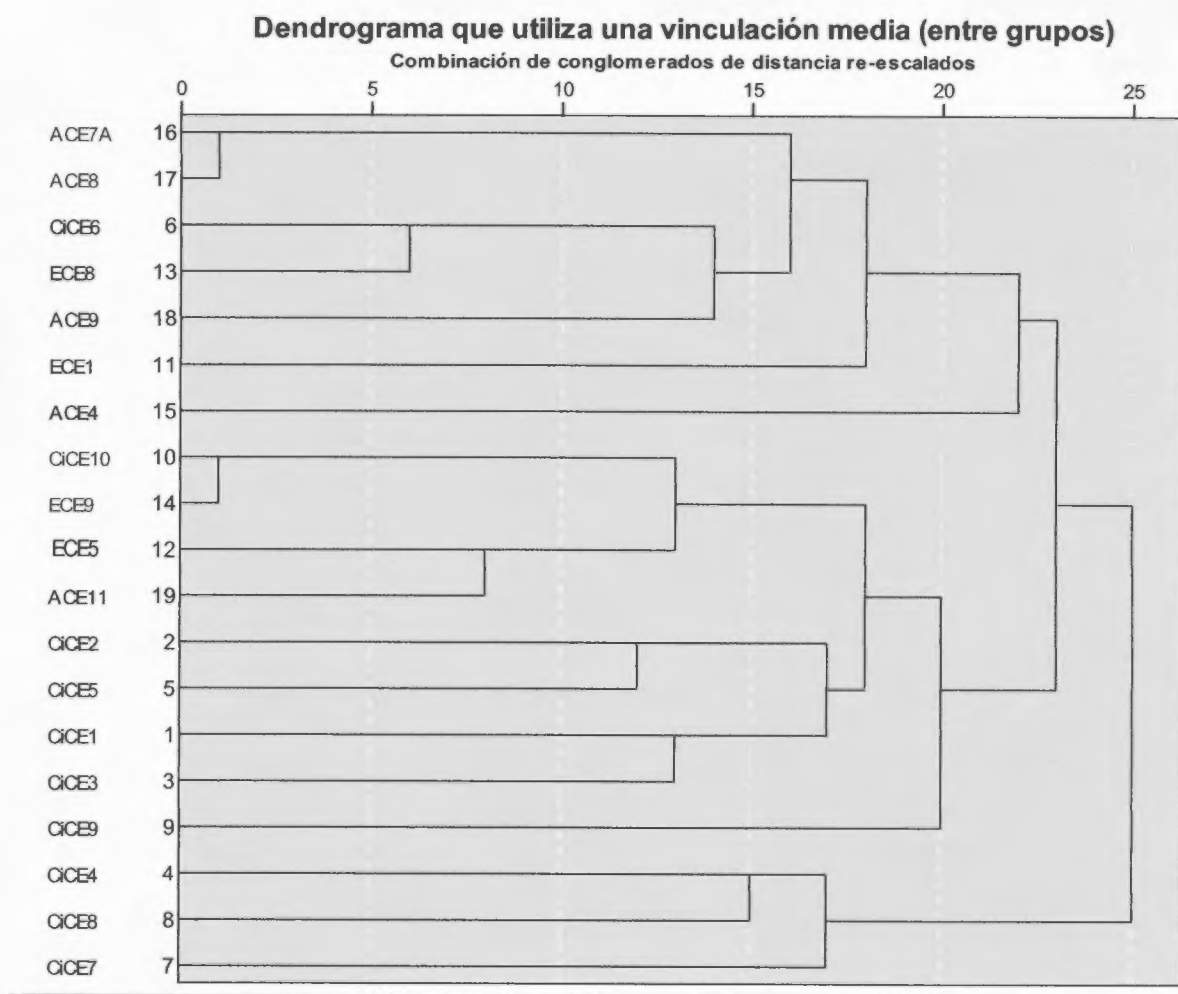


Figura 17. Dendrograma de cepas del grupo de **Cerdo**. Dendrograma mostrando el parentesco de cepas de *E. coli* aisladas de heces de cerdo en Escobal, Ciudad del Niño y El Arado.

4 2 4 1 Analisis de los resultados del grupo cerdo por la prueba de Chi-Cuadrado

Hipotesis

Ho= No existe asociacion en la diversidad genetica entre los diferentes aislados de las muestras fecales y *E coli* de cerdo y las fuentes de muestreo El Arado Ciudad del Niño y Escobal

Hi= Existe asociacion en la diversidad genetica entre los diferentes aislados de las muestras fecales y *E coli* de cerdo y las fuentes de muestreo El Arado Ciudad del Niño y Escobal

En el cuadro de contingencia podemos ver que del total de las bandas de ADN ausentes 111 corresponden a la Ciudad del Niño 66 al Arado y 49 a Escobal mientras que del total de las bandas de ADN presentes 49 se presentaron en la Ciudad del Niño 14 en El Arado y 15 en Escobal

Cuadro de contingencia de Bandas de ADN Fuente

			Fuente			Total
			Ciudad del niño	El Arado	Escobal	
Bandas de ADN	Ausente	Recuento	111	66	49	226
		Frecuencia esperada	118.9	59.5	47.6	226
	Presente	Recuento	49	14	15	78
		Frecuencia esperada	41.1	20.5	16.4	78
Total		Recuento	160	80	64	304
		Frecuencia esperada	160.0	80.0	64.0	304

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi cuadrado de Pearson	5,026	2	,081
Razon de verosimilitudes	5,190	2	,075
N de casos validos	304		

a. 0 casillas (0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia minima esperada es 16,42.

La prueba de chi cuadrado nos arroja un valor de 5,026 con 2 grados de libertad y vemos que no hay significancia por lo cual no se puede rechazar la hipótesis nula.

4.2.5 Analisis del grupo de cepas de gallina

Los resultados del estudio de las 25 cepas de *E. coli* en este grupo mostraron que hubo mucha diversidad genética detectándose 18 patrones genéticos diferentes (Figura 14 Cuadro 11). Las cepas AGA10, AGA12, CIGA7, EGA10, AGA2, EGA2 y EGA5 mostraron patrones genéticos idénticos entre sí, por lo que se consideraron que eran aislamientos del mismo clon (Coeficiente de Jaccard ≥ 0.87). Estas cepas similares representaron 36% del total de cepas evaluadas y estaban constituidas por miembros de las tres comunidades.

Se encontraron también 9 cepas posiblemente relacionadas (Coeficiente de Jaccard entre 0.7 a 0.86): CIGA10A, EGA1, EGA4, EGA8, CIGA2, CIGA5, CIGA3, CIGA4 y AGA8. El resto de las cepas analizadas no mostraron un elevado grado de similitud (Coeficiente de Jaccard < 0.70) por lo que se consideraron no relacionadas.

En general, no hubo correlación entre el origen de la cepa y el perfil genético. Por ejemplo, las cepas AGA10, CIGA7 y EGA10 fueron cepas similares o idénticas y pertenecían a la misma agrupación, pero fueron aisladas de diferentes comunidades. Por otro lado, la cepa AGA1 y AGA11 tuvieron una similitud muy distante.

Cuadro 11 Historial de Conglomeracion de datos del Grupo Gallina

Etapa	Conglomerado que se combina		Coeficientes	Etapa en la que el conglomerado aparece por primera vez		Proxima etapa
	Conglomerad o 1	Conglomerad o 2		Conglomerad o 1	Conglomerad o 2	
1	23	25	1 000	0	0	2
2	6	23	1 000	0	1	4
3	18	21	1 000	0	0	4
4	6	18	1 000	2	3	6
5	12	14	1 000	0	0	6
6	6	12	1 000	4	5	13
7	9	11	857	0	0	12
8	13	16	800	0	0	12
9	1	4	800	0	0	10
10	1	2	733	9	0	15
11	3	22	714	0	0	15
12	9	13	696	7	8	14
13	6	10	667	6	0	18
14	9	17	613	12	0	17
15	1	3	603	10	11	17
16	5	19	600	0	0	20
17	1	9	531	15	14	19
18	6	24	488	13	0	22
19	1	7	430	17	0	20
20	1	5	424	19	16	22
21	8	15	375	0	0	23
22	1	6	343	20	18	23
23	1	8	305	22	21	24
24	1	20	230	23	0	0

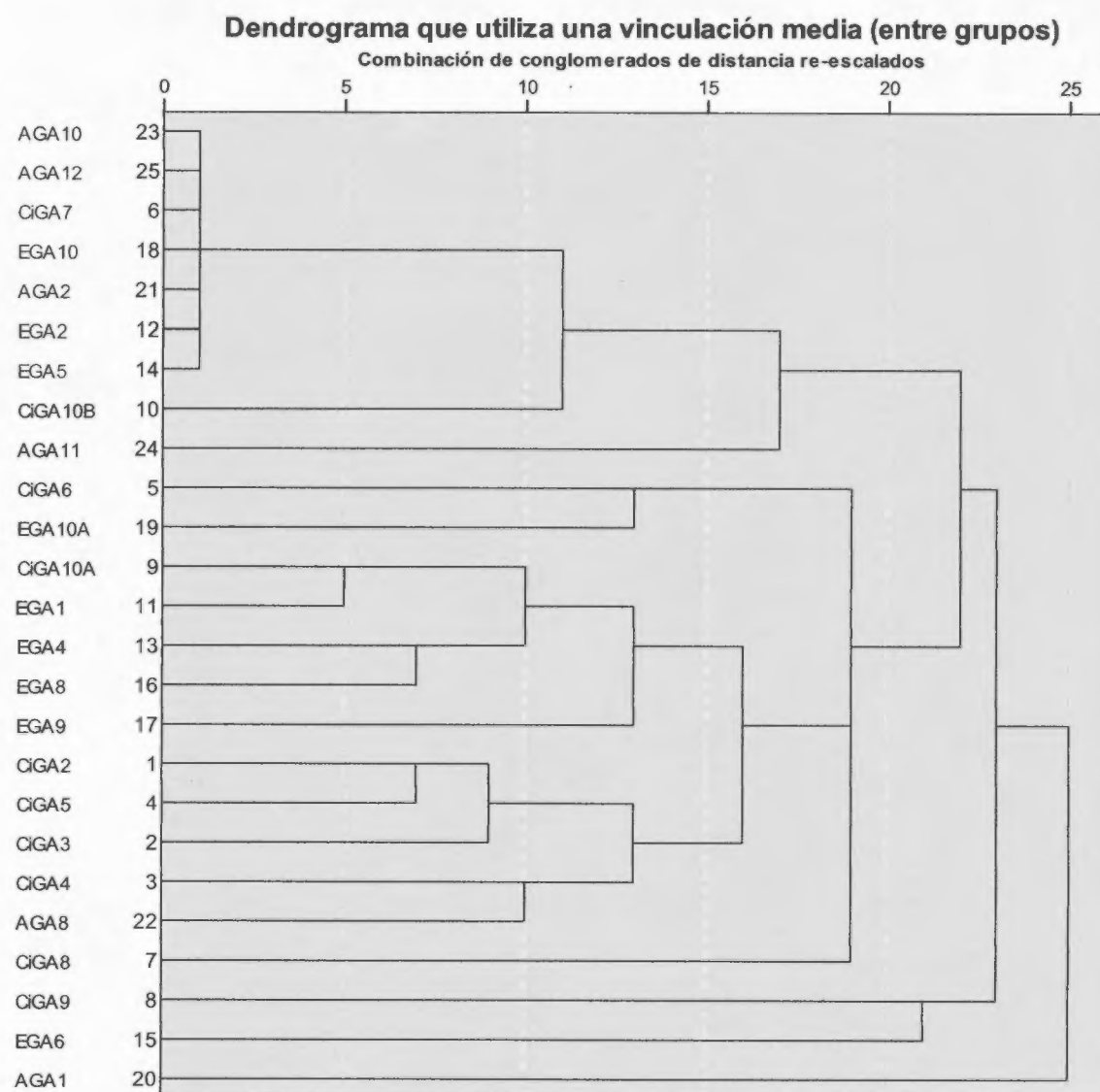


Figura 18. Dendrograma de cepas del grupo **Gallina**. Dendrograma mostrando el parentesco de cepas de *E. coli* aisladas de heces de gallinas en Escobal, Ciudad del Niño y El Arado.

4 2 5 1 Analisis de los resultados del grupo gallina por la prueba de Chi-Cuadrado

Hipotesis

Ho= No existe asociacion en la diversidad genetica entre los diferentes aislados de las muestras fecales y *E coli* de gallina y las fuentes de muestreo El Arado Ciudad del Niño y Escobal

Hi= Existe asociacion en la diversidad genetica entre los diferentes aislados de las muestras fecales y *E coli* de gallina y las fuentes de muestreo El Arado Ciudad del Niño y Escobal

En el cuadro de contingencia podemos ver que del total de las bandas de ADN ausentes 109 corresponden a la Ciudad del Niño 76 a El Arado y 104 a Escobal mientras que del total de las bandas de ADN presentes 51 se presentaron en la Ciudad del Niño 20 en El Arado y 40 en Escobal

Cuadro de contingencia de Bandas de ADN Fuente

			Fuente			Total
			Ciudad del niño	El Arado	Escobal	
Bandas de ADN	Ausente	Recuento	109	76	104	:
		Frecuencia esperada	115 6	69 4	104 0	28
	Presente	Recuento	51	20	40	-
		Frecuencia esperada	44 4	26 6	40 0	11
Total		Recuento	160	96	144	.
		Frecuencia esperada	160 0	96 0	144 0	40

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi cuadrado de Pearson	3.649	2	.161
Razon de verosimilitudes	3.749	2	.153
N de casos validos	400		

a. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 26.64.

La prueba de chi-cuadrado nos arroja un valor de 3.649 con 2 grados de libertad y vemos que no hay significancia. Por lo cual no se puede rechazar la hipótesis nula.

4.2.6 Análisis del grupo de cepas de humano

El dendrograma de las 25 cepas pertenecientes al grupo de cepas de Humano mostro una elevada diversidad genética ya que se generaron 22 patrones genéticos diferentes (Fig 15 Cuadro 12). Las cepas de *E. coli* AHu1A, AHu3A, EHu5 y EHu7 y EHu8 fueron genéticamente idénticas entre sí ya que presentaron un Coeficiente de Jaccard ≥ 0.87 . Las mismas se consideraron que eran aislamientos del mismo clon. Estas cepas similares representaron 20% del total de cepas evaluadas y pertenecían a las tres comunidades.

Las cepas CiHu4, CiHu7, CiHu9, EHu9 y CiHu1 posiblemente estaban relacionadas (Coeficiente de Jaccard entre 0.7 a 0.86). Las 15 cepas restantes mostraron poca similitud genética (Coeficiente de Jaccard < 0.70) por lo que se consideraron no relacionadas.

En el dendrograma se observa que no hubo correlación entre la fuente geográfica de aislamiento (comunidad) y la similitud genética de las cepas. Por ejemplo, el perfil genético de la cepa EHu5 aislada de la comunidad de Escobal, provincia de Colón, es idéntico al perfil de la cepa AHu1A aislada de la comunidad de El Arado, provincia de Panamá Oeste. Pertenecían al mismo grupo, mientras que las cepas EHu6 y EHu4 tuvieron una similitud muy distante.

Cuadro 12 Historial de Conglomeracion de datos del Grupo Humano

Etapa	Conglomerado que se combina		Coeficientes	Etapa en la que el conglomerado aparece por primera vez		Proxima etapa
	Conglomerad o 1	Conglomerad o 2		Conglomerad o 1	Conglomerad o 2	
1	20	22	1 000	0	0	2
2	14	20	1 000	0	1	16
3	16	17	1 000	0	0	21
4	9	18	800	0	0	6
5	4	7	750	0	0	12
6	1	9	733	0	4	12
7	5	23	667	0	0	14
8	11	19	667	0	0	18
9	8	13	667	0	0	10
10	3	8	667	0	9	17
11	2	24	600	0	0	20
12	1	4	595	6	5	15
13	6	12	571	0	0	14
14	5	6	510	7	13	19
15	1	21	509	12	0	18
16	14	15	500	2	0	22
17	3	10	500	10	0	21
18	1	11	465	15	8	19
19	1	5	455	18	14	22
20	2	25	417	11	0	23
21	3	16	393	17	3	23
22	1	14	321	19	16	24
23	2	3	311	20	21	24
24	1	2	245	22	23	0

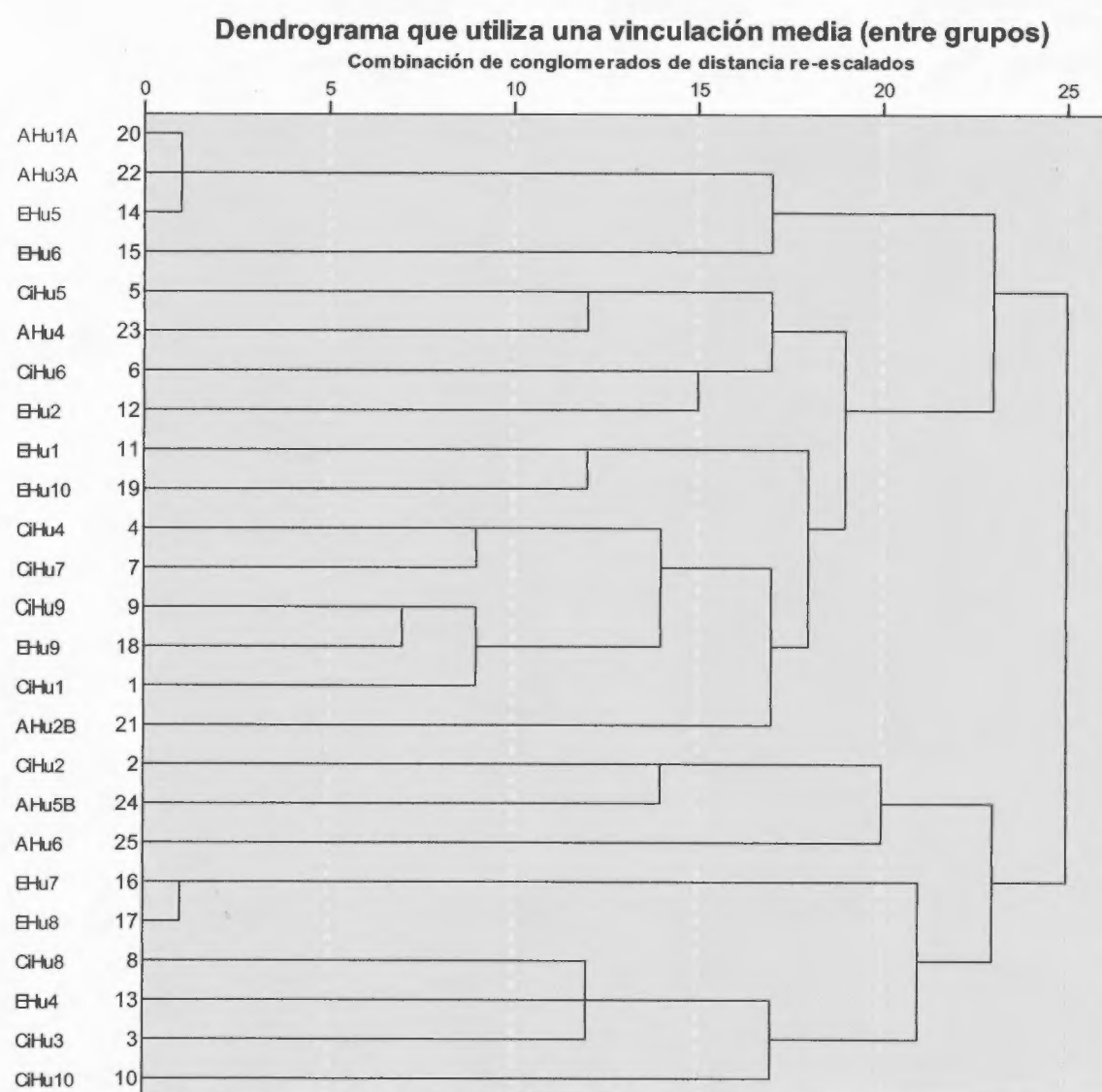


Figura 19. Dendrograma de cepas del grupo **Humano**. Dendrograma mostrando el parentesco de cepas de *Escherichia coli* aisladas de heces de humanos en Escobal, Ciudad del Niño y El Arado.

4 2 6 1 Analisis de los resultados de humano por la prueba de Chi-Cuadrado

Hipotesis

Ho= No existe asociacion en la diversidad genetica entre los diferentes aislados de las muestras fecales y *E coli* de humano y las fuentes de muestreo El Arado Ciudad del Niño y Escobal

Hi= Existe asociacion en la diversidad genetica entre los diferentes aislados de las muestras fecales y *E coli* de humano y las fuentes de muestreo El Arado Ciudad del Niño y Escobal

En el cuadro de contingencia podemos ver que del total de las bandas de ADN ausentes 107 corresponden a la Ciudad del Niño 77 a El Arado y 106 a Escobal mientras que del total de las bandas de ADN presentes 53 se presentaron en la Ciudad del Niño 19 en El Arado y 38 en Escobal

Cuadro de contingencia de Bandas de ADN Fuente

			Fuente			Total
			Ciudad del niño	El Arado	Escobal	
Bandas de ADN	Ausente	Recuento	107	77	106	2
		Frecuencia esperada	116 0	69 6	104 4	290
	Presente	Recuento	53	19	38	1
		Frecuencia esperada	44 0	26 4	39 6	110
Total		Recuento	160	96	144	4
		Frecuencia esperada	160 0	96 0	144 0	400

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi cuadrado de Pearson	5.489 ^a	2	.064
Razon de verosimilitudes	5.595	2	.061
N de casos validos	400		

a. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 26.40.

La prueba de chi cuadrado nos arroja un valor de 5.489 con 2 grados de libertad y vemos que no hay significancia por lo cual no se puede rechazar la hipótesis nula.

4.2.7 Analisis del grupo de cepas de vaca

Dendrograma que muestra la relacion genetica entre 23 cepas de *E. coli* aisladas de muestras fecales de vacas (Fig 20 Cuadro 13). El estudio de los resultados de las cepas genero 3 agrupaciones (A, B y C) y revelo 18 patrones geneticos diferentes que indican una gran diversidad genetica. Las cepas CiVA1 y AVA11, EVA1, AVA5, CiVA2 y CiVA4, CiVA3 y EVA2 fueron mas homogeneas y geneticamente mas relacionadas, presentando un Coeficiente de Jaccard ≥ 0.87 . Las cepas de *E. coli* del mismo grupo se consideraron que eran aislamientos del mismo clon. El grupo estaba conformado por miembros de las tres comunidades.

Las cepas ARVA6, CiVA8, CiVA10, EVA5, EVA8, CiVA9 y EVA3 posiblemente estaban relacionadas (Coeficiente de Jaccard entre 0.70 a 0.86). Las 8 cepas restantes mostraron poca similitud genetica (Coeficiente de Jaccard < 0.70) por lo que se consideraron no relacionadas.

En general se pudo observar que el 35% (8/23) de las cepas fueron geneticamente similares y 65% (15/23) mostraron poca similitud. No hubo correlacion entre la fuente geografica de aislamiento (comunidad) y la similitud genetica de las cepas. Por ejemplo, el perfil genetico de la cepa CiVA1 aislada de Ciudad del Niño, provincia de Panama Oeste, y la cepa AVA11 aislada de El Arado, provincia de Panama Oeste, tuvieron perfiles identicos. Sin embargo, las cepas EVA4 y EVA6 que fueron aisladas de la misma comunidad tuvieron patrones geneticos muy diferentes.

Cuadro 13 Historial de Conglomeracion de datos del Grupo Vaca

Etapa	Conglomerado que se combina		Coeficientes	Etapa en la que el conglomerado aparece por primera vez		Proxima etapa
	Conglomerad o 1	Conglomerad o 2		Conglomerad o 1	Conglomerad o 2	
1	1	23	1 000	0	0	8
2	10	19	1 000	0	0	3
3	2	10	1 000	0	2	4
4	2	4	1 000	3	0	13
5	3	11	875	0	0	14
6	14	16	833	0	0	10
7	8	12	833	0	0	10
8	1	20	800	1	0	11
9	7	9	750	0	0	11
10	8	14	696	7	6	14
11	1	7	692	8	9	15
12	13	22	667	0	0	15
13	2	21	667	4	0	17
14	3	8	625	5	10	16
15	1	13	533	11	12	17
16	3	17	528	14	0	19
17	1	2	489	15	13	20
18	5	6	444	0	0	19
19	3	5	363	16	18	21
20	1	18	344	17	0	22
21	3	15	315	19	0	22
22	1	3	273	20	21	0

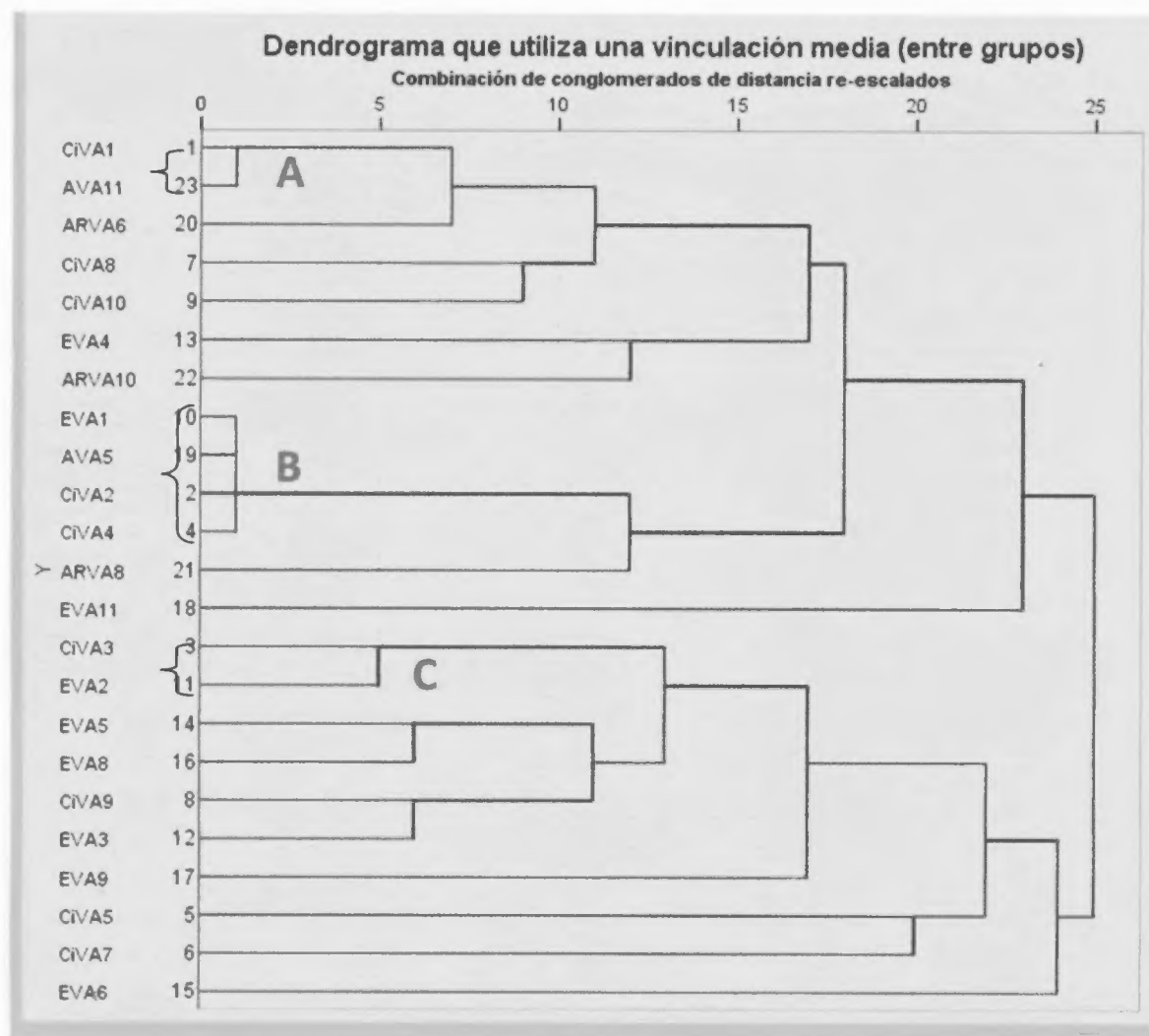


Figura 20. Dendrograma de cepas del grupo **Vaca**. Dendrograma mostrando el parentesco de cepas de *Escherichia coli* aisladas de heces de vacas en Escobal, Ciudad del Niño y El Arado.

4 2 7 1 Analisis de los resultados de vaca por la prueba de Chi-Cuadrado

Hipotesis

Ho= No existe asociacion en la diversidad genetica entre los diferentes aislados de las muestras fecales y *E coli* de vaca y las fuentes de muestreo El Arado Ciudad del Niño y Escobal

Hi= Existe asociacion en la diversidad genetica entre los diferentes aislados de las muestras fecales y *E coli* de vaca y las fuentes de muestreo El Arado Ciudad del Niño y Escobal

En el cuadro de contingencia podemos ver que del total de las bandas de ADN ausentes 102 corresponden a la Ciudad del Niño 61 a El Arado y 102 a Escobal mientras que del total de las bandas de ADN presentes 42 se presentaron en la Ciudad del Niño 19 en El Arado y 42 en Escobal

Cuadro de contingencia de Bandas de ADN Fuente						
			Fuente			Total
			Ciudad del nino	El Arado	Escobal	
Bandas de ADN	Ausente	Recuento	102	61	102	265
		Frecuencia esperada	103 7	57 6	103 7	265
	Presente	Recuento	42	19	42	103
		Frecuencia esperada	40 3	22 4	40 3	103
Total		Recuento	144	80	144	368
		Frecuencia esperada	144 0	80 0	144 0	368

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi cuadrado de Pearson	911 ^a	2	634
Razon de verosimilitudes	934	2	627
N de casos válidos	368		

a. 0 casillas (0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 22.39.

La prueba de chi-cuadrado nos arroja un valor de 0.911 con 2 grados de libertad y vemos que no hay significancia por lo cual no se puede rechazar la hipótesis nula.

4 2 8 Analisis del grupo de cepas de agua

El estudio de los resultados de la diversidad genética entre las 25 cepas aisladas del grupo Agua mostro también una elevada diversidad genética detectándose 24 patrones genéticos diferentes por ERIC PCR (Fig 17 Cuadro 14) Las 2 cepas de *E coli* que mostraron patrones idénticos entre sí se consideraron que eran aislamientos del mismo clon (Coeficiente de Jaccard ≥ 0.87) AAG6 y ARAG2 representaron el 8% de las cepas estudiadas (Fig 17)

Las cepas CiAG2 CiAG9 EAG2 B EAG9 2B EAG7 2A EAG9 1B CiAG3 EAG6 1A CiAG4 y CiAG7 posiblemente estaban relacionadas ya que tenían un Coeficiente de Jaccard entre 0.7 a 0.86 El resto de las cepas analizadas (13 cepas) no mostraron un elevado grado de similitud (Coeficiente de Jaccard < 0.70) por lo que se consideraron no relacionadas

En este grupo sí se observó correlación entre la fuente geográfica de aislamiento (comunidad) y la similitud genética de las cepas ya que las mismas (AAG6 y ARAG2) pertenecían a la comunidad de El Arado provincia de Panamá Oeste

Cuadro 14 Historial de Conglomeracion de datos del Grupo Agua

Etapa	Conglomerado que se combina		Coeficientes	Etapa en la que el conglomerado aparece por primera vez		Proxima etapa
	Conglomerad o 1	Conglomerad o 2		Conglomerad o 1	Conglomerad o 2	
1	20	24	1 000	0	0	8
2	11	18	833	0	0	10
3	16	17	833	0	0	7
4	3	12	833	0	0	7
5	4	7	833	0	0	11
6	2	9	750	0	0	18
7	3	16	696	4	3	10
8	20	25	667	1	0	19
9	1	19	667	0	0	15
10	3	11	664	7	2	13
11	4	6	643	5	0	13
12	14	21	600	0	0	16
13	3	4	575	10	11	15
14	13	23	571	0	0	21
15	1	3	506	9	13	17
16	8	14	500	0	12	19
17	1	10	445	15	0	18
18	1	2	412	17	6	20
19	8	20	381	16	8	22
20	1	15	337	18	0	21
21	1	13	323	20	14	23
22	8	22	311	19	0	24
23	1	5	204	21	0	24
24	1	8	196	23	22	0

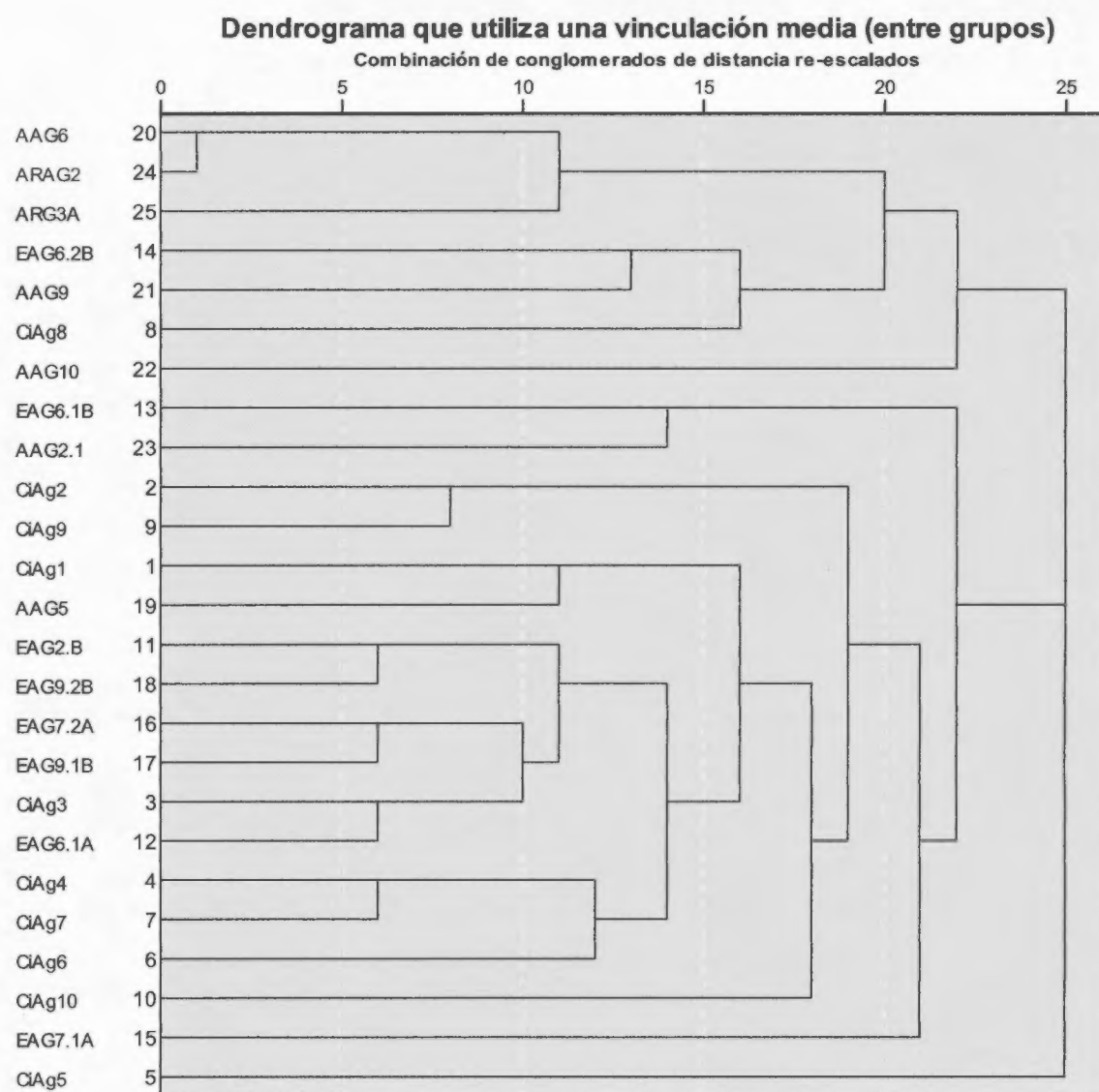


Figura 21. Dendrograma de cepas del grupo **Agua**. Dendrograma mostrando el parentesco de cepas de *Escherichia coli* aisladas de aguas en Escobal, Ciudad del Niño y El Arado.

4 2 8 1 Analisis de los resultados de agua por la prueba de Chi-Cuadrado

Hipotesis

Ho= No existe asociacion en la diversidad genetica entre los diferentes aislados de las muestras fecales y *E coli* de agua y las fuentes de muestreo El Arado Ciudad del Niño y Escobal

Hi= Existe asociacion en la diversidad genetica entre los diferentes aislados de las muestras fecales y *E coli* de agua y las fuentes de muestreo El Arado Ciudad del Niño y Escobal

En el cuadro de contingencia podemos ver que del total de las bandas de ADN ausentes 110 corresponden a la Ciudad del Niño 86 a El Arado y 91 a Escobal mientras que del total de las bandas de ADN presentes 50 se presentaron en la Ciudad del Niño 26 en El Arado y 37 en Escobal

Cuadro de contingencia de Bandas de ADN Fuente

			Fuente			Total
			Ciudad del niño	El Arado	Escobal	
Bandas de ADN	Ausente	Recuento	110	86	91	287
		Frecuencia esperada	114.8	80.4	91.8	287
	Presente	Recuento	50	26	37	113
		Frecuencia esperada	45.2	31.6	36.2	113
Total		Recuento	160	112	128	400
		Frecuencia esperada	160.0	112.0	128.0	400

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi cuadrado de Pearson	2.139	2	.343
Razon de verosimilitudes	2.181	2	.336
N de casos validos	400		

a. 0 casillas (0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 31.64.

La prueba de chi-cuadrado nos arroja un valor de 2.139 con 2 grados de libertad y vemos que no hay significancia por lo cual no se puede rechazar la hipótesis nula.

4 2 9 Analisis total de cepas de las comunidades y grupos

El dendrograma completo de las 117 cepas de *E coli* pertenecientes a las tres comunidades y a los 5 grupos muestreados mostro una elevada diversidad genetica ya que se generaron 77 patrones geneticos diferentes (Fig 18) Este dendrograma genero 17 agrupaciones definidas a un coeficiente de similitud de 0 87

Las cepas EGA10 ECE9 AGA2 EGA2 EGA5 EVA1 EHu5 CiCE10 CiAg8 CiVA4 CiGA7 AHu3A CiVA2 AVA5 AHu1A AGA10 y AGA12 ARVA6 y CiCE6 CiGA3 ECE8 AVA11 y CiVA1 CiGA2 EAG6 2B AHu2B y CiVA10 AGA11 y ACE11 EHu1 EAG7 1A y EVA11 ACE7A ACE8 y ARG3A AAG6 y ARAG2 CiCE2 y CiAg2 EHu7 y EHu8 CiVA5 y CiCE8 CiVA7 y CiHu8 CiVA3 y EVA2 EAG6 1A EGA4 y CiHu1 CiGA10A EVA5 y EGA1 CiAg1 EVA8 y CiHu5 EVA4 y EGA9 fueron mas homogeneas y geneticamente mas relacionadas presentando un Coeficiente de Jaccard ≥ 0.87 Las cepas de *E coli* del mismo grupo se consideraron que eran aislamientos del mismo clon Varios grupos estaban conformados por miembros de las tres comunidades

Las cepas CiCE3 EHu9 CiHu9 CiGA4 AGA8 EHu10 EVA9 EGA8 CiHu7 CiCE1 CiAg3 EVA3 CiVA9 EAG9 1B EAG7 2A CiAg4 EHu2 CiAg7 CiHu4 CiCE5 EGA6 EAG9 2B EAG2 B EGA10A AAG2 1 CiHu3 CiCE4 CiAg9 CiHu2 CiGA9 AGA1 ARVA10 CiVA8 AAG9 ECE5 y CiGA5 posiblemente estaban relacionadas (Coeficiente de Jaccard entre 0.70 a 0.86) Las 22 cepas restantes mostraron poca similitud genetica (Coeficiente de Jaccard < 0.70) por lo que se consideraron no relacionadas

En general se pudo observar que el 49.6 % (58/117) de las cepas fueron geneticamente similares y 50.4% (59/117) mostraron poca similitud En este dendrograma se observo que no hubo correlacion entre la fuente geografica de aislamiento (comunidad) y la similitud genetica de las cepas Por ejemplo el perfil genetico de la cepa CiGA10A aislada de Ciudad del Niño provincia de

Panama Oeste y la cepa EVA5 aislada de Escobal provincia de Colon tuvieron perfiles identicos al 100% Sin embargo las cepas ACE4 y ARVA8 que pertenecen a El Arado provincia de Panama Oeste estuvieron poco relacionadas (Fig 18) La prueba de chi-cuadrado arroja un valor de 14 998 y se ve que en la prueba existe significancia por lo cual se rechaza la hipotesis nula y se acepta la hipotesis de investigacion Sin embargo esta relación que es estadisticamente significativa muestra un coeficiente de contingencia bajo

ID	Conglomerados		Código	Uso en Conglomerados		Prima taxa
	Conglomerado 1	Conglomerado 2		Código primario	Uso en Conglomerados	
1	1	1	1	1	1	1
2	2	2	2	2	2	2
3	3	3	3	3	3	3
4	4	4	4	4	4	4
5	5	5	5	5	5	5
6	6	6	6	6	6	6
7	7	7	7	7	7	7
8	8	8	8	8	8	8
9	9	9	9	9	9	9
10	10	10	10	10	10	10
11	11	11	11	11	11	11
12	12	12	12	12	12	12
13	13	13	13	13	13	13
14	14	14	14	14	14	14
15	15	15	15	15	15	15
16	16	16	16	16	16	16
17	17	17	17	17	17	17
18	18	18	18	18	18	18
19	19	19	19	19	19	19
20	20	20	20	20	20	20
21	21	21	21	21	21	21
22	22	22	22	22	22	22
23	23	23	23	23	23	23
24	24	24	24	24	24	24
25	25	25	25	25	25	25
26	26	26	26	26	26	26
27	27	27	27	27	27	27
28	28	28	28	28	28	28
29	29	29	29	29	29	29
30	30	30	30	30	30	30
31	31	31	31	31	31	31
32	32	32	32	32	32	32
33	33	33	33	33	33	33
34	34	34	34	34	34	34
35	35	35	35	35	35	35
36	36	36	36	36	36	36
37	37	37	37	37	37	37
38	38	38	38	38	38	38
39	39	39	39	39	39	39
40	40	40	40	40	40	40
41	41	41	41	41	41	41
42	42	42	42	42	42	42
43	43	43	43	43	43	43
44	44	44	44	44	44	44
45	45	45	45	45	45	45
46	46	46	46	46	46	46
47	47	47	47	47	47	47
48	48	48	48	48	48	48
49	49	49	49	49	49	49
50	50	50	50	50	50	50
51	51	51	51	51	51	51
52	52	52	52	52	52	52
53	53	53	53	53	53	53
54	54	54	54	54	54	54
55	55	55	55	55	55	55
56	56	56	56	56	56	56
57	57	57	57	57	57	57
58	58	58	58	58	58	58
59	59	59	59	59	59	59
60	60	60	60	60	60	60
61	61	61	61	61	61	61
62	62	62	62	62	62	62
63	63	63	63	63	63	63
64	64	64	64	64	64	64
65	65	65	65	65	65	65
66	66	66	66	66	66	66
67	67	67	67	67	67	67
68	68	68	68	68	68	68
69	69	69	69	69	69	69
70	70	70	70	70	70	70
71	71	71	71	71	71	71
72	72	72	72	72	72	72
73	73	73	73	73	73	73
74	74	74	74	74	74	74
75	75	75	75	75	75	75
76	76	76	76	76	76	76
77	77	77	77	77	77	77
78	78	78	78	78	78	78
79	79	79	79	79	79	79
80	80	80	80	80	80	80
81	81	81	81	81	81	81
82	82	82	82	82	82	82
83	83	83	83	83	83	83
84	84	84	84	84	84	84
85	85	85	85	85	85	85
86	86	86	86	86	86	86
87	87	87	87	87	87	87
88	88	88	88	88	88	88
89	89	89	89	89	89	89
90	90	90	90	90	90	90
91	91	91	91	91	91	91
92	92	92	92	92	92	92
93	93	93	93	93	93	93
94	94	94	94	94	94	94
95	95	95	95	95	95	95
96	96	96	96	96	96	96
97	97	97	97	97	97	97
98	98	98	98	98	98	98
99	99	99	99	99	99	99
100	100	100	100	100	100	100

Cuadro 15 Historial de Conglomeracion de datos completos de todas las fuentes y sitios de muestreo

4 2 9 1 Analisis de la base de datos completa por la prueba de Chi-Cuadrado

Hipotesis

Ho= No existe asociacion en la diversidad genetica entre los diferentes aislados de las muestras fecales y de *E coli* y las fuentes de muestreo El Arado Ciudad del Niño y Escobal

Hi= Existe asociacion en la diversidad genetica entre los diferentes aislados de las muestras fecales y de *E coli* y las fuentes de muestreo El Arado Ciudad del Niño y Escobal

En el cuadro de contingencia podemos ver que del total de las bandas de ADN ausentes 539 corresponden a la Ciudad del Niño 366 a El Arado y 452 a Escobal mientras que del total de las bandas de ADN presentes 245 se presentaron en la Ciudad del Niño 98 en El Arado y 172 en Escobal

Cuadro de contingencia de Bandas de ADN Fuente

			Fuente			Total
			Ciudad del nino	El Arado	Escobal	
Bandas de ADN	Ausente	Recuento	539	366	452	1357
		Frecuencia esperada	568.3	336.4	452.3	1357
	Presente	Recuento	245	98	172	515
		Frecuencia esperada	215.7	127.6	171.7	515
Total		Recuento	784	464	624	1872
		Frecuencia esperada	784.0	464.0	624.0	1872

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi cuadrado de Pearson	14.998	2	.001
Razon de verosimilitudes	15.388	2	.000
N de casos validos	1872		

a. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 127.65.

La prueba de chi-cuadrado arroja un valor de 14.998 con 2 grados de libertad y se ve que en la prueba existe significancia por lo cual se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis de investigación. Sin embargo, esta relación que es estadísticamente significativa muestra un coeficiente de contingencia bajo (Coeficiente de contingencia = 0.089, $p < 0.05$).

DISCUSIÓN

5.1 Determinación de la presencia de plásmidos en cepas de *E. coli*

La resistencia antimicrobiana es uno de los problemas más graves que existe en la actualidad para el control y tratamiento de las enfermedades de origen bacteriano. La resistencia antimicrobiana, la cual está basada en la plasticidad genética de la bacteria, ha surgido como consecuencia de la presión selectiva ejercida por el uso indiscriminado de antimicrobianos en la medicina humana, medicina veterinaria, producción animal, producción pesquera, tecnología de alimentos y agricultura (Schwarz *et al.* 2001, Cabello 2006, Martins da Costa *et al.* 2013). Las bacterias resistentes a las drogas seleccionadas por esta presión pueden diseminarse a los humanos por el suministro de alimentos (por ejemplo, carne, pescado, huevos y productos lácteos), contacto directo con animales o indirectamente a través del ambiente (Hammerum y Heuer 2009, Wellington *et al.* 2013, Martins da Costa *et al.* 2013). Muchas de estas bacterias albergan los genes de resistencia a antibióticos en plataformas genéticas móviles (plásmidos, transposones e integrones), capaces de diseminarse entre las comunidades bacterianas de aguas y suelos (Baquero *et al.* 2008). Estos genes de resistencia a antibióticos pueden ser movilizados y transferidos a otras bacterias de la misma especie o de diferentes especies o géneros a través del proceso de conjugación. La resistencia adquirida a antibióticos no solo sucede en bacterias patógenas, sino también en la flora endógena o normal de individuos o poblaciones expuestas (Rahman *et al.* 2008) y en bacterias no patógenas del ambiente (saprofitos).

Los resultados del presente estudio mostraron que en las tres comunidades hubo una significativa prevalencia de plásmidos, lo que sugiere que tanto los animales de granjas como los humanos estuvieron en contacto con agentes antimicrobianos. Los resultados del estudio de Yee y Batista (2010), donde determinaron patrones de resistencia antimicrobiana en estas cepas de *E. coli*, confirman nuestros hallazgos. En general, ellas reportaron altos porcentajes de

resistencia a antibioticos como penicilina tetraciclina trimetropin/sulfametxol cloranfenicol etc en los aislamientos de *E coli* de la comunidad de Ciudad del Niño y la menor resistencia a los antibioticos ensayados en los aislamientos de *E coli* de Escobal

En nuestro estudio las muestras de heces humanas de la comunidad del Arado y las muestras de heces de gallinas de la comunidad de Escobal presentaron porcentajes significativos de prevalencia de plasmidos. El principal reservorio de bacilos Gram-negativos resistentes a multiples drogas como la *E coli* es el intestino del humano y animales particularmente aquellos que reciben antibióticos. La *E coli* es una bacteria comensal del intestino de aves ganado y cerdos que son criados para la produccion de alimentos. Los alimentos de origen animal pueden contaminarse con ésta bacteria durante el sacrificio de los animales o durante la puesta de huevos (Hammerum y Heuer 2009). Se han detectado los mismos genes de resistencia antimicrobiana en animales y/o su carne y en humanos lo cual indica una diseminación horizontal de genes. También se han detectado antibióticos en aguas para consumo humano y en peces provenientes de cuerpos de aguas contaminados (Wellington *et al* 2013). La exposicion a estas bacterias puede tambien ocurrir via inhalación del polvo emitido de las instalaciones donde el animal se cria intensamente (limpieza de corrales) y se producen descargas de materia fecal.

Diferentes estudios en animales han demostrado que el intestino es un lugar ideal donde ocurre frecuentemente la transferencia horizontal de genes de resistencia entre *E coli* (Licht *et al* 2003 Hart *et al* 2006). La transferencia horizontal de genes de resistencia tambien ha sido detectada en el intestino de humanos (Trobos *et al* 2008). Despues de la ingestion la mayoria de las bacterias pasan a traves del intestino sin causar enfermedad sin embargo dentro del hospedero humano hay amplias oportunidades para la transferencia horizontal de genes permitiendo a que los genes de resistencia a antibioticos formen parte de la microflora normal del intestino humano (Wellington *et al* 2013). Es probable que la

microflora normal del intestino humano pueda actuar como un reservorio de genes de resistencia los cuales pueden ser subsecuentemente transferidos a microorganismos patógenos

En este estudio las cepas de *E. coli* provenientes de muestras de aguas de la comunidad de Escobal presentaron la mayor prevalencia de plásmidos. En los ambientes acuáticos las excretas de animales y humanos conteniendo bacterias patógenas y potencialmente patógenas son liberadas constantemente con las aguas residuales. El agua constituye no solo una forma de diseminación de organismos resistentes a antibióticos entre poblaciones humanas y animales sino también una ruta en la cual los genes de resistencia son introducidos en los ecosistemas naturales bacterianos (Baquero *et al* 2008). Se ha documentado que algunas sustancias antimicrobianas pueden sobrevivir al tratamiento de las aguas residuales siendo liberadas al suelo y cuerpos de agua (Martins da Costa *et al* 2013). Los antibióticos no son destruidos por nuestro cuerpo luego que son ingeridos de modo que cuando son eliminados del cuerpo estos pueden permanecer largo tiempo en el ambiente favoreciendo su exposición con las bacterias e incrementando así el desarrollo de la resistencia bacteriana (Mendez 2006).

La conjugación de plásmidos con genes de resistencia a múltiples drogas entre bacterias patógenas provenientes de humanos, animales y peces y cepas de un nicho ecológico diferente ha sido demostrada en una variedad de ambientes simulados de alimentos procesados (Kruse y Sorum 1994). En éstos estudios *in vitro* los plásmidos R fueron transferidos del patógeno humano *V. cholerae* a el patógeno de peces *Aeromonas salmonicida* en agua de mar. Similarmente la transferencia fue observada entre un patógeno de peces *A. salmonicida* y una cepa de *E. coli* de origen humano en un filete de salmón crudo.

Actualmente el problema de la resistencia de antibióticos y su incremento a nivel mundial está bien documentado y el vínculo potencial entre resistencia a antibióticos en animales y humanos ha sido reconocido. La Organización de las

Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) la Organización Internacional de Epizootias (OIE) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) han mostrado preocupación en este tema y han producido documentos aportando recomendaciones para la utilización adecuada de este tipo de fármacos. Se deben realizar más estudios para determinar los genes de resistencia presentes en Enterobacteriaceas a fin de tomar serias medidas para prevenir la emergencia y diseminación de bacterias resistentes a antibióticos.

5.2 Caracterización de la diversidad genética de cepas de *E. coli*

El objetivo principal de este estudio fue determinar la diversidad genética de cepas de *E. coli* aisladas de muestras fecales de humanos y animales y muestras de aguas en tres comunidades de Panamá. No obstante a nivel mundial se han realizado diversos estudios para analizar la relación genética que existe entre cepas de *E. coli* aisladas de diferentes fuentes tales como heces de animales y humanos, muestras clínicas, ambientales y alimentos (Wan *et al.* 2011, Dombek *et al.* 2000, Ateba y Mbewe 2013, 2014, Orsi *et al.* 2007, De Moura *et al.* 2001, Hui Yong *et al.* 2008, 2009, McLellan *et al.* 2003, Leung *et al.* 2004, Lu *et al.* 2005, Casarez *et al.* 2007, Adzitey 2013, Ramazanzadeh *et al.* 2013, Oltramari *et al.* 2014, Yuan *et al.* 2010, Lyautey *et al.* 2010, Dos Anjos *et al.* 2003).

En este estudio el ERIC-PCR fue utilizado para tipificar 117 cepas de *E. coli* aisladas de tres comunidades en Panamá. El análisis del ERIC-PCR se empleó para amplificar diversas regiones del ADN que son flanqueadas por secuencias conservadas para generar patrones genéticos que son específicos para aislados particulares. La técnica de ERIC-PCR ha probado ser rápida, sencilla, apropiada y económica para la diferenciación de microorganismos (Olive y Bean 1999). Este es un método ampliamente utilizado en los análisis de tipificación del ADN y ha mostrado diferenciar satisfactoriamente cepas de *E. coli* (Adzitey 2013, Hui Yong *et al.* 2009, Yuan *et al.* 2010, Dombek *et al.* 2000).

En general los resultados de la tipificación por ERIC-PCR en cada uno de los grupos o fuentes revelaron patrones genéticos variables en donde se observó un alto grado de polimorfismo. También se observó que la similitud entre la mayoría de las cepas fue baja (entre 16 a 60%) mostrando patrones únicos que indican que derivaron de distintas cepas parentales.

En cada grupo o fuente (vacas, cerdos, gallinas, humanos y aguas) los dendrogramas mostraron que las agrupaciones con perfiles genéticos similares o idénticos (Coeficiente de similitud ≥ 0.87) estaban conformadas por cepas aisladas de las tres comunidades muestreadas, sugiriendo la diseminación de clones de *E. coli* entre las mismas. Cepas en la misma agrupación pero aisladas de diferentes comunidades sugiere una posible contaminación cruzada. Estas agrupaciones estaban conformadas mayormente por cepas aisladas de las comunidades de El Arado y Ciudad del Niño, que son lugares geográficamente cercanos, ambos de la provincia de Panama Oeste. El suelo y las fuentes de aguas pudieron contaminarse con aislados fecales de *E. coli* en estas comunidades y ser transportadas de un lugar a otro. Los animales salvajes y de compañía también son una fuente importante de diseminación de enteropatógenos y por lo tanto de genes. Las cepas similares o idénticas formaron tres agrupaciones en el grupo de cepas de VACA, una agrupación en el grupo de cepas de GALLINA, dos agrupaciones en el grupo de cepas de CERDO, dos agrupaciones en el grupo de cepas de HUMANO y una agrupación en el grupo de cepas de AGUA. Todas estas cepas derivaron de un solo clon.

Los resultados de la tipificación por ERIC-PCR en cada una de las comunidades también mostraron patrones genéticos variables en donde se observó una elevada diversidad genética. El porcentaje de cepas de *E. coli* que fueron similares o idénticas en las comunidades evaluadas fue de 45% (13/29) en El Arado, 38.5% (15/39) en Escobal y 34.7% (17/49) en Ciudad del Niño. Un buen porcentaje de cepas derivaron del mismo clon.

En cada comunidad los dendrogramas mostraron que las agrupaciones con perfiles genéticos similares o idénticos estaban conformadas por cepas aisladas de las diferentes fuentes (vacas, cerdos, gallinas, humanos y aguas) sugiriendo la diseminación de clones de *E. coli* entre ellas. Las cepas similares o idénticas formaron más agrupaciones por comunidad que por tipo de fuente. En la comunidad de El Arado hubo 4 agrupaciones, en Escobal hubo 5 agrupaciones y en Ciudad del Niño 7 agrupaciones.

Los resultados de la tipificación de las 117 cepas de *E. coli* por ERIC-PCR, donde se incluyeron todas las fuentes y comunidades, permitieron evidenciar que el 49,6% (58/117) de las mismas tuvieron coeficientes de similitud $\geq 0,87$. Aproximadamente la mitad de las agrupaciones (8/17) estaban conformadas por cepas aisladas de la misma comunidad. Solo dos agrupaciones pertenecían a la misma fuente y comunidad. En el resto de las agrupaciones hubo aislados de diferentes fuentes y comunidades. Es probable que dentro de cada comunidad haya contaminación cruzada de origen fecal entre los diferentes animales de granja, humanos y fuentes de aguas. El análisis y la comparación de aislados de *E. coli* de diferentes fuentes puede generar importante información sobre el origen y transmisión de esta bacteria (Foley *et al.* 2009). La heterogeneidad genética entre los aislados obtenidos en ambientes naturales puede deberse a diferencias entre sitios de muestreos, particularmente cuando el sitio de muestreo está sujeto a una alta contaminación de diversas fuentes (Dos Anjos 2003).

Los resultados de este trabajo son coincidentes con los de Ramazanzadeh *et al.* (2013), donde ellos reportaron una alta diversidad genética entre 230 aislados de *E. coli* de diferentes centros hospitalarios en Irán. En otra investigación realizada con 133 aislados de *E. coli* provenientes de dos reservorios de agua potable de Brasil, los estudios de diversidad genética mostraron una elevada heterogeneidad genética entre los aislados de estos reservorios (Orsi *et al.* 2007). Lyautey *et al.* (2010) caracterizaron 21 307 aislados de *E. coli* en aguas superficiales en Ontario, Canadá. Las poblaciones de *E. coli* probaron ser genotípicamente diversas, muy

parecido a lo observado en nuestro estudio aunque se observaron genotipos dominantes a través de los sitios de muestreo estaciones y años de muestreo a diferencia de lo observado en este estudio donde no hubo cepas dominantes ni a nivel de sitio ni a nivel del tipo de muestra

Además Wan *et al* (2011) reportaron en su estudio que la diversidad de cepas de *E coli* de granjas de cerdos en la provincia de Sichuan China fue alta igual que en nuestro estudio El análisis del ERIC-PCR mostro que las 34 cepas se agruparon en 19 grupos con un coeficiente de similitud de 0.78 Ateba y Mbewe (2014) describieron el amplio rango de variabilidad genética de cepas de *E coli* O157 H7 aisladas de muestras fecales de cerdos ganado y humanos muestras de aguas y muestras de carne de cerdo y vaca en Sur Africa coincidiendo también con lo observado en nuestro estudio En este estudio estos investigadores reportaron que el ERIC-PCR fue capaz de distinguir entre los aislados de sitios de muestreo particular y/o especies a diferencia de lo observado en este estudio donde no se logro distinguir cepas de *E coli* aisladas por tipo de fuente pero si de comunidad Desde un punto de vista técnico es probable que utilizando otras técnicas moleculares con mayor poder discriminatorio y aumentando el número de cepas a estudiar se pudiera dilucidar mejor la estructura y distribución clonal de estas cepas

La información presentada en este estudio revela la necesidad de intensificar los controles higiénicos-sanitarios en las diferentes etapas de crianza y venta de los animales o de sus productos alimenticios así como en la disposición correcta de sus excretas También se deben implementar medidas que permitan la vigilancia epidemiológica de cepas bacterianas potencialmente patógenas presentes en granjas de animales y sus alrededores

CONCLUSIONES

- 1 De las 112 cepas de *E coli* analizadas 79 fueron positivas para ADN plasmidico (70.5%) La comunidad de Ciudad del Niño fue la que presento mayor prevalencia de plasmidos con 44.3% seguido de Escobal con 31.6% y por ultimo El Arado con 24.1%
- 2 Las cepas de *E coli* provenientes de las muestras de aguas de la comunidad de Escobal (32%) fueron las que presentaron la mayor prevalencia de plasmidos
- 3 En la comunidad de El Arado las cepas de *E coli* provenientes de muestras fecales humanas fueron las de mayor prevalencia de plasmidos con un 31.6% En la comunidad de Ciudad del Niño las cepas de *E coli* provenientes de muestras fecales de cerdos y humanos fueron las de mayor prevalencia de plasmidos con un 22.9% en cada una
- 4 Se encontro una elevada diversidad genetica entre las cepas de *E coli* dentro de cada grupo y en cada comunidad evaluada En el dendrograma completo de todas las cepas se generaron 77 patrones geneticos diferentes y 17 agrupaciones
- 5 No se observo correlacion entre la fuente o grupo (animal humano o agua) y la similitud genetica de las cepas
- 6 No se observo correlacion entre la fuente geografica de aislamiento (comunidad) y la similitud genetica de las cepas
- 7 Se encontro patrones de similitud por comunidades cuando se evaluaron todas las cepas de todas las comunidades juntas permitiendo evidenciar que el 49.6% (58/117) de las mismas tuvieron coeficientes de similitud ≥ 0.87 Aproximadamente la mitad de las agrupaciones (8/17) estaban conformadas por cepas aisladas de la misma comunidad lo que puede significar que hay un grado de transmision horizontal entre las diferentes cepas en cada comunidad

RECOMENDACIONES

- 1 Realizar estudios similares en otras regiones de Panama a fin de establecer una base de datos
- 2 Realizar estudios a nivel molecular para determinar la presencia y diseminacion de grupos patogenos de *E coli* en ecosistemas acuaticos en Panama
- 3 Incluir en el estudio muestras de suelos ya que pueden ser un ambiente optimo para el crecimiento de organismos entericos
- 4 Evaluar la variabilidad espacial y temporal de cepas de *E coli* en aguas y suelos
- 5 Realizar estudios epidemiologicos en granjas de animales para identificar perfiles de resistencia a antibioticos genes de virulencia y grupos clonales con relevancia para la salud publica

BIBLIOGRAFÍA

- 1 **ADZITEY, F** 2013 Genetic diversity of *Escherichia coli* isolated from ducks and the environment using Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Pak J Biol Sci 16(20) 1173-1178
- 2 **ANDERSON, M J WHITLOCK and V HARWOOD** 2006 Diversity and distribution of *Escherichia coli* genotypes and antibiotic resistance phenotypes in feces of humans cattle and horses Appl Environ Microbiol 72(11) 6914-6922
- 3 **APHA, AWWA y WEF** 2012 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Edicion 22
- 4 **ASLAM, M , F NATTRESS, G GREER, C YOST, C GILL y L MC MULLEN** 2003 Origin of contamination and genetic diversity of *Escherichia coli* in beef cattle 69(5) 2794-2799
- 5 **ATEBA, C y M MBEWE** 2013 Determination of the genetic similarities of fingerprints from *Escherichia coli* O157 H7 isolated from different sources in the North West Province South Africa using ISR BOXAIR and REP-PCR analysis Microbiol Res 168 438-446
- 6 **ATEBA, C y M MBEWE** 2014 Genotypic characterization of *Escherichia coli* O157 H7 isolates from different sources in the North-West Province South Africa using Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR analysis Int J Mol Sci 15(6) 9735 9747
- 7 **BALDY-CHUDZIK, K y M STOSIK** 2005 Specific genomic fingerprints of *Escherichia coli* strains with Repetitive Sequences and PCR as an effective tool for monitoring freshwater environments Pol J Environ Stud 14(5) 551-557
- 8 **BALOWS, A H TRUPER, M DWORKIN, W HARDER, K SCHLEIFER** 1992 *The Prokaryotes* Vol 3 New York/Berlin Springer Verlag 2nd ed P 4126
- 9 **BAQUERO, F , J MARTINEZ y R CANTON** 2008 Antibiotics and antibiotic resistance in water environments Curr Opin Biotechnol 19 260 265
- 10 **BERMUDEZ, M y T HAZEN** 1988 Phenotypic and Genotypic Comparison of *Escherichia coli* from Pristine Tropical Waters Appl Environ Microbiol 54(4) 979-983
- 11 **BERGTHORSSON, U y H OCHMAN** 1998 Distribution of chromosome length variation in natural isolates of *Escherichia coli* Mol Biol Evol 15(1) 6-16

- 12 **BERTHE, T M RATAJCZAK O CLERMONT, E DENAMUR y F PETIT** 2013 Evidence for coexistence of distinct *Escherichia coli* populations in various aquatic environments and their survival in estuary water *Appl Environ Microbiol* 79 (15) 4684-4693
- 13 **BETTELHEIM, K** 1992 The Genus *Escherichia* The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria Ecophysiology isolation identification applications Springer-Verlag New York Inc
- 14 **BLANCH, A B GALOFRE, F LUCENA, A TERRADILLOS, X VILANOVA Y F RIBAS** 2007 Characterization of bacterial coliform occurrences in different zones of a drinking water distribution system *J Appl Microbiol* 102 711 721
- 15 **BLATTNER, F , G PLUNKETT, C BLOCH, N PERNA, V BURLAND, M RILEY, J COLLADO-VIDES, J GLASNER, C RODE, G MAYHEW, J GREGOR, N DAVIS, H KIRKPATRICK, M GOEDEN, D ROSE, B MAU y Y SHAO** 1997 The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12 *Science* 277(5331) 1453-1462
- 16 **BRENNAN, F , F ABRAM, F CHINALIA, K RICHARDS, y V O FLAHERTY** 2010 Characterization of environmentally persistent *Escherichia coli* isolates leached from an Irish soil *Appl Environ Microbiol* 76 (7) 2175-2180
- 17 **BYAPPANAHALLI, M , R WHITMAN, D SHIVELY, M SADOWSKY y S ISHII** 2006 Population structure persistence and seasonality of autochthonous *Escherichia coli* in temperate coastal forest soil from a Great Lakes watershed *Environ Microbiol* 8 (3) 504-513
- 18 **BYAPPANAHALLI M , T YAN M HAMILTON, S ISHII, R FUJIOKA R WHITMAN y M SADOWSKY** 2012 The population structure of *Escherichia coli* isolated from subtropical and temperate soils *Sci Total Environ* 417-418 273-279
- 19 **BYAPPANAHALLI, M , M FOWLER, D SHIVELY y R WHITMAN** 2003 Ubiquity and persistence of *Escherichia coli* in a midwestern coastal stream *Appl Environ Microbiol* 69 (8) 4549-4555
- 20 **CABELLO, F** 2006 Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture A growing problem for human and animal health and for the environment *Environ Microbiol* 8 1137-1144
- 21 **CABRAL, J** 2010 Water Microbiology Bacterial pathogens and water *Int J Environ Res Public Health* 7(10) 3657-3703

- 22 **CAMPER, A , G McFETERS, W CHARACKLIS y W JONES** 1991 Growth kinetics of coliform bacteria under conditions relevant to drinking water distribution systems *Appl Environ Microbiol* 57 (8) 2233-2239
- 23 **CARSON, C , B SHEAR, M ELLERSIECK y A ASFAW** 2001 Identification of Fecal *Escherichia coli* from humans and animals by Ribotyping *Appl Environ Microbiol* 67(4) 1503-1507
- 24 **CARSON, C , B SHEAR M ELLERSIECK y J SCHNELL** 2003 Comparison of Ribotyping and Repetitive Extragenic Palindromic-PCR for Identification of Fecal *Escherichia coli* from humans and animals *Appl Environ Microbiol* 69(3) 1836-1839
- 25 **CASAREZ, E PILLAI, S y G DI GIOVANNI** 2007 Genotype diversity of *Escherichia coli* isolates in natural waters determined by PFGE Y ERIC-PCR *Water Res* 41 3643-3648
- 26 **CFSPH** 2009 Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections [http //www cfsph iastate edu/Factsheets/pdfs/e_coli pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/e_coli.pdf)
- 27 **CHAUDHURI, R y I HENDERSON** 2012 The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny *Infect Genet Evol* 12(2) 214-226
- 28 **CONTE, M C LONGHI, M MARAZZATO, A CONTE, M ALEANDRI, M LEPANTO, C ZAGAGLIA, M NICOLETTI, M ALOI, V TOTINO, A PALAMARA y S SCHIPPA** 2014 Adherent-invasive *E coli* (AIEC) in pediatric Crohn s disease patients phenotypic and genetic pathogenic features *BMC Res Notes* (7) 748
- 29 **CROXEN, M R LAW, R SCHOLZ, K KEENEY, M WLODARSKA Y B FINLAY** 2013 Recent Advances in understanding enteric pathogenic *E coli* *Clin Microbiol Rev* 26(4) 822-880
- 30 **DA COSTA, M M SA e SILVA, D SPRICIGO, N WITT, S MARCHIORO L KOLLING y A CASTAGNA** 2006 Caracterizaco epidemiologica molecular e perfil de resistencia aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatorios suinos do sul do Brasil *Pesq Vet Bras* 26(1) 5-8
- 31 **DIAS DA SILVEIRA, W , A FERREIRA, M LANCELLOTTI, I BARBOSA, D LEITE, A DE CASTRO y M BROCCHI** 2002 Clonal relationships among avian *Escherichia coli* isolates determined by enterobacteria repetitive intergenic consensus (ERIC-PCR) *Vet Microbiol* 89 323-328
- 32 **DIAZ, E , A FERRANDEZ, M PRIETO y J GARCIA** 2001 Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli* *Microbiol Mo*

- 33 **DE MOURA, A , K IRINO y M VIDOTTO** 2001 Genetic variability of Avian *Escherichia coli* strains evaluated by Enterobacterial repetitive intergenic consensus and Repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction Avian Dis 45 173-181
- 34 **DOMBEK, P , L JOHNSON, S ZIMMERLEY M SADOWSKY** 2000 Use of Repetitive DNA Sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources Appl Environ Microbiol 66(6) 2572-2577
- 35 **DOS ANJOS, L , V D VECIA y G CORCAO** 2003 Characterization and genetic diversity via REP-PCR of *Escherichia coli* isolates from polluted waters in southern Brazil FEMS Microbiol Ecol 45 173-180
- 36 **EDBERG, S , V PISCITELLI y M CARTTER** 1986 Phenotypic characteristics of coliform and noncoliform bacteria from a public water supply compared with regional and national clinical species Appl Environ Microbiol 52(3) 474-478
- 37 **EDBERG, S , J PATTERSON y D SMITH** 1994 Differentiation of distribution systems source water and clinical coliforms by DNA analysis J Clin Microbiol 32(1) 139 142
- 38 **EDBERG, S , E RICE, R KARLIN y M ALLEN** 2000 *Escherichia coli* the best biological drinking water indicator for public health protection J Appl Microbiol 88 106S 116S
- 39 **ESCOBAR-PARAMO, P , K GRENET, A LE MENAC'H, L RODE, E SALGADO, C AMORIN, S GOURIOU, B PICARD M CHERIF RAHIMY, A ANDREMONT, E DENAMUR y R RUIMY** 2004 Large-Scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates Appl Environ Microbiol 70(9) 5698-5700
- 40 **FAIRBROTHER, J y E NADEAU** 2006 *Escherichia coli* on farm contamination of animals Rev Sci Tech Off Int Epiz 25(2) 555-569
- 41 **FDA** 2002 Bacteriological Analytical Manual Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria
[http //www fda gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949 htm](http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm)
- 42 **FERNANDEZ, F L LOPEZ y A HERNANDEZ** 2013 Tecnicas de tipificacion molecular para la vigilancia y control de la infeccion Enferm Infecc Microbiol Clin 31(Supl 1) 20-25

- 43 **FIELD, K y M SAMADPOUR** 2007 Fecal source tracking the indicator paradigm and managing water quality *Water Res* 41 3517-3538
- 44 **FUJIOKA, R, C SIAN-DENTON, M BORJA, J CASTRO, y K MORPHEW** 1999 Soil The environmental source of *Escherichia coli* and Enterococci in Guam s streams *J Appl Microbiol* 85 83S 89S
- 45 **JOHNSON, J y T OBRYAN** 2000 Improved Repetitive Element PCR Fingerprinting for Resolving Pathogenic and Nonpathogenic Phylogenetic Groups within *Escherichia coli* *Clin Diagn Lab Immunol* 7(2) 265 273
- 46 **JOHNSON, J J BROWN y J MASLOW** 1998 Clonal distribution of the three alleles of the Gal (α 1-4) Gal—Specific adhesin gene *papG* among *Escherichia coli* strains from patients with bacteremia *J Infect Dis* 177 651-661
- 47 **JOHNSON, L, M BROWN, E CARRUTHERS, J FERGUSON, P DOMBEK y M SADOWSKY** 2004 Sample size library composition and genotypic diversity among natural populations of *Escherichia coli* from different animals influence accuracy of determinig sources of fecal fecal pollution *Appl Environ Microbiol* 70(8) 4478-4485
- 48 **GORDON, D** 2001 Geographical structure and host specificity in bacteria and the implications for tracing the source of coliform contamination *Microbiology* 147 1079-1085
- 49 **GORDON, D y A COWLING** 2003 The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates host and geographic effects *Microbiology* 149 3575-3586
- 50 **GORDON, D y J LEE** 1999 The genetic structure of enteric bacteria from Australian mammals *Microbiology* 145 2673-2682
- 51 **GOTO, D y T YAN** 2011 Genotypic diversity of *Escherichia coli* in the water and soil of Tropical Watersheds in Hawaii *Appl Environ Microbiol* 77 (12) 3988-3997
- 52 **GYLES, C y P BOERLIN** 2014 Horizontally transferred genetic elements and their role in pathogenesis of bacterial disease *Vet Pathol* 51(2) 328-340
- 53 **HALLIDAY, E y R GAST** 2011 Bacteria in beach sands an emerging challenge in protecting coastal water quality and bather health *Environ Sci Technol* 45(2) 370-379
- 54 **HAMMERUM, A y O HEUER** 2009 Human Health Hazards from

Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* of Animal Origin Clin Infect Dis
48 916 921

- 55 **HARRINGTON, S , E DUDLEY y J NATARO** 2006 Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection Minireview FEMS Microbiol Lett 254 12-18
- 56 **HEALTH CANADA** 2012 Guidelines for Canadian Drinking Water Quality Guideline Technical Document- Total Coliforms Water Air and Climate Change Bureau Healthy Environments and Consumer Safety Branch Health Canada Ottawa Ontario www healthcanada gc ca
- 57 **HUI YONG, D , C TONG JIE C YU MEI, Z ZHAO BING, Y MEI LING y Z XING XIAO** 2008 Transmission identification of *Escherichia coli* aerosol in chicken houses to their environments using ERIC-PCR Sci China Ser C- Life Sci 51(2) 164 173
- 58 **HUI YONG, D , C TONG JIE, L JIANZHU, Z XINGXIAO, Q CHUNHUA, G JING, W YALING, C YUMEI, M ZENGMIN, Y MEILING y S GERD** 2009 Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR Environ Res 109 511-517
- 59 **HULTON, C , C HIGGINS y P SHARP** 1991 ERIC sequences a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli* *Salmonella typhimurum* and other enterobacteria Mol Microbiol 5(4) 825-834
- 60 **ISHII, S y M SADOWSKY** 2008 *Escherichia coli* in the Environment Implications for Water Quality and Human Health Minireview Microbes Environ 23(2) 101-108
- 61 **ISHII, S y M SADOWSKY** 2009 Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity ecology and evolution Environ Microbiol 11(4) 733 740
- 62 **ISHII, S , W KSOLL, R HICKS y M SADOWSKY** 2006 Presence and growth of naturalized *Escherichia coli* in temperate soils from Lake Superior Watersheds Appl Environ Microbiol 72(1) 612 621
- 63 **ISHII, S , D HANSEN, R HICKS y M SADOWSKY** 2007 Beach sand and sediments are temporal sinks and sources of *Escherichia coli* in Lake Superior Environ Sci Technol 41(7) 2203 2209
- 64 **ISHII, S , T YAN, H VU, D HANSEN, R HICKS y M SADOWSKY** 2010 Factors Controlling Long-Term Survival and Growth of Naturalized *Escherichia coli* Populations in Temperate Field Soils Microbes Environ 25(1) 8-14

- 65 **KSOLL, W , S ISHII, M SADOWSKY y R HICKS** 2007 Presence and sources of fecal coliform bacteria in epilithic periphyton communities of Lake Superior *Appl Environ Microbiol* 73(12) 3771-3778
- 66 **KRIEG, N** 1984 *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* First edition Williams & Wilkins Co Baltimore
- 67 **KRUSE, H y H SORUM** 1994 Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments *Appl Environ Microbiol* 60(11) 4015-4021
- 68 **LAWRENCE, J y H OCHMAN** 1998 Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome *Proc Natl Acad Sci USA* (95) 9413-9417
- 69 **LECLERC, H , D MOSSEL, S EDBERG y C STRUIJK** 2001 Advances in the bacteriology of the Coliform Group: their suitability as markers of microbial water safety *Annu Rev Microbiol* 55 201-234
- 70 **LEUNG, K MACKERETH R , TIEN Y , TOPP, E** 2004 A comparison of AFLP and ERIC-PCR analyses for discriminating *Escherichia coli* from cattle, pig and human sources *FEMS Microbiol Ecol* 47 111-119
- 71 **LEYER, G , L WANG y E JOHNSON** 1995 Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods *Appl Environ Microbiol* 61(10) 3752-3755
- 72 **LU, Z , D LAPEN, A SCOTT, A DANG y E TOPP** 2005 Identifying host sources of fecal pollution: Diversity of *Escherichia coli* in confined dairy and swine production systems *Appl Environ Microbiol* 71(10) 5992-5998
- 73 **LUKJANCENKO, O , T WASSENAAR y D USSERY** 2010 Comparison of 61 sequenced *Escherichia coli* genomes *Microb Ecol* 60(4) 708-720
- 74 **LYAUTEY, E , Z LU, D LAPEN, G WILKES, A SCOTT T BERKERS T EDGE y E TOPP** 2010 Distribution and diversity of *Escherichia coli* populations in the South Nation River Drainage Basin, Eastern Ontario, Canada *Appl Environ Microbiol* 76(5) 1486-1496
- 75 **MAIER, R , I PEPPER y C GERBA** 2000 Environmentally Transmitted Pathogens. En Rusin P, Enriquez C, Johnson D y C Gerba (eds) *Environmental Microbiology* Academic Press, California. Pages 450-451
- 76 **MARTINS DA COSTA, P , L LOUREIRO y A MATOS** 2013 Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: The interface between humans, animals and the environment *Int J Environ Res Public Health* 10 278-294

- 77 **McLELLAN, S** 2004 Genetic diversity of *Escherichia coli* isolated from urban rivers and beach water Appl Environ Microbiol 70(8) 4658-4665
- 78 **McLELLAN, S, A DANIELS y A SALMORE** 2003 Genetic characterization of *Escherichia coli* populations from host sources of fecal pollution by using DNA fingerprinting Appl Environ Microbiol 69(5) 2587-2594
- 79 **MEACHAM K, L ZHANG, B FOXMAN, R BAUER y C MARRS** 2003 Evaluation of genotyping large numbers of *Escherichia coli* isolates by enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR J Clin Microbiol 41(11) 5224-5226
- 80 **MENDEZ, J** 2006 Evaluacion y comparacion del patron de susceptibilidad a antibioticos de bacilos Gram negativos aislados de una quebrada aledaña a un hospital clase A y de la quebrada Los Negritos Hidrogenesis 4(1)
- 81 **MILKMAN, R** 1997 Recombination and Population Structure in *Escherichia coli* Genetics 146 745 750
- 82 **MOHAPATRA, B y A MAZUMDER** 2008 Comparative efficacy of five different Rep-PCR methods to discriminate *Escherichia coli* populations in aquatic environments Water Sci Technol 58(3) 537-547
- 83 **MOHAPATRA, B, K BROERSMA y A MAZUMDER** 2007 Comparison of five Rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans poultry and wild birds FEMS Microbiol Lett 277 98-106
- 84 **MOHAPATRA, B, K BROERSMA, R NORDIN y A MAZUMDER** 2007 Evaluation of Repetitive Extragenic Palindromic-PCR for discrimination of fecal *Escherichia coli* from humans and different domestic and wild animals Microbiol Immunol 51(8) 733-740
- 85 **NATARO J y J KAPER** 1998 Diarrheagenic *Escherichia coli* Clin Microbiol Rev 11(1) 142-201
- 86 **NATARO, J, T STEINER y R GUERRANT** 1998 Enteroaggregative *Escherichia coli* Emerg Infect Dis 4(2) 251-261
- 87 **OCHMAN, H y R SELANDER** 1984 Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations J Bacteriol 157(2) 690 693
- 88 **OLIVE, D y P BEAN** 1999 Principles and applications of methods for DNA based typing of microbial organisms J Clin Microbiol 37(6) 1661

- 89 **OLTRAMARI, K , R FRESSATI, E PATUSSI, A BARRETO y J GRATON** 2014 Genetic heterogeneity of *Escherichia coli* isolated from pasteurized milk in State of Parana Brazil Braz J Pharm Sci 50(2) 337-343
- 90 **ORSI, R N STOPPE, M SATO, T GOMES, P PRADO, G MANFIO y L OTTOBONI** 2007 Genetic variability and pathogenicity potential of *Escherichia coli* isolated from recreational water reservoirs Res Microbiol 158 420-427
- 91 **PAIVA DE SOUZA, C** 2006 *Escherichia coli* as a specialized bacterial pathogen Rev Biol Cienc Terra 6(2) 341-350
- 92 **PERNA, N , G PLUNKETT, V BURLAND, B MAU, J GLASNER D ROSE, G MAYHEW, P EVANS, J GREGOR, H KIRKPATRICK, G POSFAL, et al** 2001 Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 H7 Nature 409 529-533
- 93 **PICARD, B , J GARCIA, S GOURIOU, P DURIEZ, N BRAHIMI, E BINGEN, J ELION y E DENAMUR** 1999 The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection Infect Immun 67(2) 546-553
- 94 **RAMAZANZADEH, R S ZAMANI y S ZAMANI** 2013 Genetic diversity in clinical isolates of *Escherichia coli* by Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR technique in Sanandaj hospitals Iran J Microbiol 5(2) 126-131
- 95 **RAHMAN, M , B RAHMAN y B RAHMAN** 2008 Antibioqram and plasmid profile analysis of isolated *Escherichia coli* from broiler and layer Res J Microbiol 3(2) 82-90
- 96 **RASKO, D M ROSOVITZ G MYERS E MONGODIN W F FRICKE P GAJER, J CRABTREE, M SEBAIHIA, N THOMSON, R CHAUDHURI, et al** 2008 The pangenome structure of *Escherichia coli* comparative genomic analysis of *E coli* commensal and pathogenic isolates J Bacteriol 190(20) 6881- 6893
- 97 **RILEY, M y D GORDON** 1999 The ecological role of bacteriocins in bacterial competition Trends Microbiol 7(3) 129-133
- 98 **RIVERA, S , T HAZEN y G TORANZOS** 1988 Isolation of fecal coliforms from pristine sites in a Tropical Rain Forest Appl Environ Microbiol 54(2) 513-517

- 99 **RODRIGUEZ ANGELES, G** 2002 Principales características y diagnostico de los grupos patogenos de *Escherichia coli* Salud Publica Mex 44(5) 464-474
- 100 **SADOWSKY M y S MATTESON** 2010 Growth survival and genetic structure of *E coli* found in Ditch Sediments and Water at the Seven Mile Creek Watershed Project Report to Minnesota Department of Agriculture
- 101 **SANCHEZ, P, R MUÑOZ y N GUTIERREZ** 2012 Resistencia bacteriana a los antibioticos mecanismos de transferencia Spei Domus 8(17) 31 37
- 102 **SAVAGEAU, M** 1983 *Escherichia coli* habitats cell types and molecular mechanisms of gene control Am Nat 122 732 744
- 103 **SCHWARZ, S, KEHRENER, C y WALSH, T** 2001 Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production Int J Antimicrob Agents 17 431–437
- 104 **SCOTT, T, J ROSE, T JENKINS, S FARRAH y J LUKASIK** 2002 Microbial Source Tracking Current Methodology and Future Directions Appl Environ Microbiol 68(12) 5796-5803
- 105 **SOLO-GABRIELE, H M WOLFERT, T DESMARAIS y C PALMER** 2000 Sources of *Escherichia coli* in a Coastal Subtropical Environment Appl Environ Microbiol 66(1) 230-237
- 106 **SOUSA, C P** 2006 The versatile strategies of *Escherichia coli* pathotypes A Mini Review J Venom Anim Toxins incl Trop Dis 12(3) 363 373
- 107 **SOUSA, C P** 2006 *Escherichia coli* as a specialized bacterial pathogen Rev Biol Cienc Terra 6(2) 341-350
- 108 **SOUZA, V, M ROCHA, A VALERA y L EGUIARTE** 1999 Genetic structure of natural populations of *Escherichia coli* in wild hosts on different continents Appl Environ Microbiol 65(8) 3373-3385
- 109 **SOUZA, V, A CASTILLO, M ROCHA, L SANDNER, C SILVA y L EGUIARTE** 2001 Ecologia evolutiva de *Escherichia coli* INCI 26(10) 513 517
- 110 **STENUTZ, R A WEINTRAUB y G WIDMALM** 2006 The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens FEMS Microbiol Rev 30 382-403

- 111 **TENAILLON, O , D SKURNIK, B PICARD y E DENAMUR** 2010 The population genetics of commensal *Escherichia coli* Nature Reviews 8 207-217
- 112 **TILDEN, J , W YOUNG, A McNAMARA, C CUSTER, B BOESEL, M LAMBERT-FAIR, J MAJKOWSKI, D VUGIA, S WERNER, J HOLLINGSWORTH y J MORRIS** 1996 A new route of transmission for *Escherichia coli* infection from dry fermented salami Am J Public Health 86(8) 1142-1145
- 113 **TOPP, E M WELSH, Y TIEN, A DANG, G LAZAROVITS, K CONN, H ZHU** 2003 Strain-dependent variability in growth and survival of *Escherichia coli* in agricultural soil FEMS Microbiol Ecol 44(3) 303 308
- 114 **TOUCHON, M , C HOEDE, O TENAILLON, V BARBE, S BAERISWYL, P BIDET, E BINGEN, S BONACORSI, C BOUCHIER, O BOUVET, et al** 2009 Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths PLoS Genet 5(1) e1000344
- 115 **TYAGI, V , A CHOPRA, A KAZMI y A KUMAR** 2006 Alternative microbial indicators of faecal pollution Current perspective Iran J Environ Health Sci Eng 3(3) 205-216
- 116 **USEPA** 2002 Implementation guidance for ambient water quality criteria for bacteria EPA-823 B-003 Washington D C
- 117 **VAN ELSAS, J , A SEMENOV, R COSTA y J TREVORS** 2011 Survival of *Escherichia coli* in the environment fundamental and public health aspects Minireview ISME 5 173-183
- 118 **VERSALOVIC J , T KOEUTH y J LUPSKI** 1991 Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes Nucl Acids Res 19(24) 6823-6831
- 119 **VOGEL L E VAN OORSCHOT, H MAAS, B MINDERHOUD y L DIJKSHOORN** 2000 Epidemiologic typing of *Escherichia coli* using RAPD analysis ribotyping and serotyping Clin Microbiol Infect 6 82-87
- 120 **WALK, S E ALM, D GORDON, J RAM, G TORANZOS, J TIEDJE y T WHITTAM** 2009 Cryptic lineages of the genus *Escherichia* Appl Environ Microbiol 75(20) 6534-6544
- 121 **WAN, L Z WANG, Q YAN, X WANG, Y LEI, L ZUO Y CHENG Y REN y W GUO** 2011 Genetic diversity of *Escherichia coli* isolated from commercial swine farms revealed by enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) and repetitive extragenic palindrome PCR

(REP-PCR) Afr J Biotechnol 10(51) 10543 10550

- 122 **WELLINGTON, E A BOXALL, P CROSS, E FEIL, W GAZE, P HAWEY, A JOHNSON-ROLLINGS, D JONES N LEE W OTTEN, C THOMAS y A PRYSOR** 2013 The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria Lancet Infect Dis 13(2) 155-165
- 123 **WHITTAM, T, H OCHMAN y S SELANDER** 1983 Multilocus genetic structure in natural populations of *Escherichia coli* Proc Natl Acad Sci 80 1751-1755
- 124 **WHITMAN, R y M NEVERS** 2003 Foreshore sand as a source of *Escherichia coli* in Nearshore Water of a Lake Michigan Beach Appl Environ Microbiol 69(9) 5555-5562
- 125 **WHITMAN, R D SHIVELY, H PAWLIK, M NEVERS, y M BYAPPANAHALLI** 2003 Ocurrance of *Escherichia coli* and Enterococci in *Cladophora* (Chlorophyta) in Nearshore Water and Beach Sand of Lake Michigan Appl Environ Microbiol 69(8) 4714-4719
- 126 **WHO** 2003 Emerging issues in water and infectious diseases Geneva [http //www who int/water_sanitation_health/emerging/en/emerging pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/en/emerging.pdf)
- 127 **WHO** 2004 Water Sanitation and Hygiene Links to Health facts and figures [http //www who int/water_sanitation_health/en/factsfigures04 pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/en/factsfigures04.pdf)
- 128 **WHO** 2008 Guidelines for Drinking-Water Quality 3rd edition Volume 1 Recommendations Geneva Switzerland [http //www who int/water_sanitation_health/dwq/fulltext pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/fulltext.pdf)
- 129 **WHO** 2013 Diarrhoeal disease [http //www who int/mediacentre/factsheets/fs330](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330)
- 130 **WILSON, L y P SHARP** 2006 Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) Sequences in *Escherichia coli* Evolution and Implications for ERIC PCR Mol Biol Evol 23(6) 1156-1168
- 131 **WINFIELD, M y E GROISMAN** 2003 Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli* Appl Environ Microbiol 69(7) 3687-3694
- 132 **YEE, Y y G BATISTA** 2010 Patrones de resistencia antimicrobiana er cepas de *Escherichia coli* procedentes de muestras fecales y de aguas Tesis de Licenciatura Universidad de Panama Panama P 51 52 56-58

- 133 YUAN, W , T CHAI y Z MIAO 2010 ERIC-PCR identification of the spread of airborne *Escherichia coli* in pig houses Sci Total Environ 408 1446-1450